

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología Molecular

**ALTERACIONES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA
INDUCIDAS POR PROTEASAS VIRALES**

TESIS DOCTORAL

Alfredo Castelló Palomares
Madrid, 2008

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el **Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”**, bajo la dirección del Dr. Luis Carrasco Llamas, con la financiación de una beca FPI y de los proyectos BMC2003-00494 y BFU2006-02182 otorgados por el Ministerio de Educación y Ciencia.

A mis padres y a
Patricia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a Luis por haberme dado la oportunidad de incorporarme a su grupo de trabajo y por su dirección y consejo.

Esta tesis no la podría haber realizado sin el apoyo de los compañeros que estuvieron y están en el antaño laboratorio 206 y ahora 120. Entre ellos, quiero agradecer a Raquel por su paciencia al enseñarme a dar los primeros pasos por un laboratorio lleno de botes... A nuestro Kike, por ser un compañero y amigo dentro y fuera de las paredes del laboratorio. A Miguel Ángel, por su siempre inestimable ayuda y por las jornadas de cañas. A la vieja guardia: Celia, Carlos, Susana, Raquel Bello, Marta, Mario, Rebe, Rudi, Fátima y Patri. Y cómo no, a aquellos con los que hoy en día comparto laboratorio: Ewelina de Polonia, Natalia, Diana, Ruth, Pablo y Javi. También quiero agradecer a todos los vecinos del CBM que me han ayudado en el tiempo que llevo aquí. En especial: al gran Alfonso (mi *Smeagol*), Jose Mari, Ricardo, Iván, Juan, Emilio y Juanjo.

A mi familia, porque siempre han confiado en mí y me han apoyado en todo. En especial, durante la escritura de esta tesis doctoral, que no hubiese sido igual sin las comidas de mi madre y las cervezas con mi padre. También a mi abuelo por despertar mi curiosidad por la ciencia desde pequeño. Y, como no, a mi tía Lola por su soporte logístico durante estos meses.

Por último, quería agradecer a mis amigos, por aguantarme hablando de cosas con nombres raros que sólo les interesa por mí: Jose, Sevi, Alfonso, Lucas y César. Y cómo no, a Vanesita, por hacerme olvidar de vez en cuando que estaba escribiendo una tesis, por sus ánimos, su paciencia, su alegría y su apoyo.

Índice



ÍNDICE

ABREVIATURAS

Abreviaturas	1
--------------	---

SUMMARY

Resumen en inglés (Summary)	3
-----------------------------	---

INTRODUCCIÓN

1. La iniciación de la traducción en eucariotas	5
1.1.1. Formación del complejo de preiniciación 43S	5
1.1.2. Unión del complejo de preiniciación 43S al mRNA	7
1.1.3. Migración del complejo de preiniciación 43S a través del mRNA	8
1.1.4. Unión de la subunidad ribosómica 60S al complejo de preiniciación	9
1.2. El factor de iniciación de la traducción 4G (eIF4G)	9
1.2.1. La familia de factores eIF4G	9
1.2.2. Estructura y función de eIF4G	10
1.3. La proteína de unión a la cola de poli(A) (PABP)	13
1.3.1. Estructura de las formas de PABP citoplásmicas	13
1.3.2. Papel de PABP en la síntesis de proteínas	14
1.4. Modificación de la maquinaria de traducción y transcripción por proteasas virales	15
1.4.1. Proteólisis de eIF4G por proteasas virales	16
1.4.2. Papel del corte de eIF4G en la iniciación de la traducción dependiente de <i>cap</i> y en la iniciación interna	17
1.4.3. Proteólisis de PABP por proteasas virales	19
1.4.4. Proteólisis de otros factores implicados en la traducción	20
1.4.5. Interferencia de las proteasas de picornavirus con el núcleo celular	20

OBJETIVOS

Objetivos	23
-----------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Manipulación de células bacterianas	25
2.1.1. Bacterias	25
2.1.2. Medios de Cultivo para <i>E. coli</i>	25
2.1.3. Mantenimiento y crecimiento de bacterias	25
2.1.4. Obtención de bacterias competentes	25
2.1.5. Transformación de <i>E.coli</i> por choque térmico	25
2.1.6. Obtención de DNA plasmídico	26
2.2. Manipulación de ácidos nucleicos	26
2.2.1. Manipulación del DNA en procesos de clonación	26
2.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
2.2.3. Oligonucleótidos	26
2.2.4. Separación electroforética de DNA y RNA en geles de agarosa	26
2.2.5. Extracción de DNA de geles de agarosa	27
2.2.6. Plásmidos	27
2.2.7. Extracción de RNA y RT-PCR a tiempo real	30
2.2.8. Transcripción <i>in vitro</i>	30
2.2.9. siRNAs	31
2.2.10. Aislamiento del RNA nuclear y citoplasmático de células de mamífero	31
2.2.11. Ensayo de <i>splicing in vitro</i>	31
2.2.12. Traducción <i>in vitro</i>	32
2.3. Manipulación de células de mamífero y virus	33
2.3.1. Líneas celulares de mamífero	33
2.3.2. Virus	33
2.3.3. Mantenimiento y cultivo de líneas celulares	34
2.3.4. Expresión transitoria en células de mamífero	34
2.3.5. Ensayo de <i>splicing</i> en células en cultivo	35
2.3.6. Marcaje metabólico de proteínas y obtención de extractos	35
2.3.7. Microscopía óptica	35
2.3.8. Microscopía confocal	35
2.3.9. Detección de los mRNAs por hibridación <i>in situ</i> (FISH)	36
2.4. Manipulación de proteínas	36
2.4.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida	36
2.4.2. Tinción con azul de Coomassie y fluorografía-autorradiografía	36

2.4.3. Inmunodetección de proteínas por <i>western blot</i>	37
2.4.4. Sueros y anticuerpos	37
2.4.5. Valoración de la concentración de proteínas	39
2.4.6. Aislamiento de proteínas del núcleo y citoplasma de células de mamífero	40
2.4.7. Purificación de proteínas	40
2.4.8. Ensayos proteolíticos	40
2.4.9. Medida de la actividad luciferasa	40

RESULTADOS

3.1. Efecto de la hidrólisis de eIF4GI y eIF4GII en la traducción de mRNAs celulares y virales	41
3.1.1. Transfección de células HeLa con mRNAs que codifican para la proteasa 2A del PV: efecto en la síntesis de proteínas celulares	41
3.1.2. Corte diferencial de eIF4GI y eIF4GII en células HeLa X1/5: efecto en la traducción de mRNAs pre-existentes o sintetizados <i>de novo</i>	43
3.1.3. Requerimiento diferencial de eIF4GI y II para la traducción de los mRNAs de Luc sintetizados <i>de novo</i> o pre-existentes	47
3.1.4. Repercusión de la hidrólisis de eIF4GI y eIF4GII en la traducción de distintas variantes de mRNAs de luciferasa transcritos <i>in vitro</i>	49
3.1.5. Estudio de la iniciación de la traducción en células transfectadas con EMC-2A	51
3.1.6. Efecto del corte de eIF4GI y eIF4GII en la traducción dirigida por los IRES de picornavirus	52
3.1.7. Efecto del corte de eIF4GI y eIF4GII en la traducción del mRNA de Hsp70	55
3.1.8. Correlación de la inhibición de la síntesis de proteínas celulares con la proteólisis de eIF4GII en células BHK	58
3.1.9. Depleción de las proteínas de la familia eIF4G en células humanas	59
3.1.10. Crecimiento celular y síntesis de proteínas en situaciones de déficit de factores de iniciación de la traducción	62
3.2. Alteración del <i>splicing</i> y de la exportación de mRNAs del núcleo al citoplasma por la proteasa 2A del PV	65
3.2.1. Alteración de la exportación de RNAs del núcleo al citoplasma por 2A ^{pro}	65

3.2.2. Localización subcelular de los mRNAs en células transfectadas con e EMC-2A	68
3.2.3. Localización subcelular de los productos de corte de eIF4GI y eIF4GII en células que expresan 2A ^{pro}	70
3.2.4. Distribución de los mRNAs en células depletadas de eIF4GI y eIF4GII	72
3.2.5. Efecto de 2A ^{pro} en el <i>splicing</i> de mRNAs	74
3.2.6. <i>Splicing in vitro</i> en presencia de proteasas virales	77
3.3. Hidrólisis de PABP por la proteasa de HIV. Efectos en la síntesis de proteínas	78
3.3.1. PABP es hidrolizada en células infectadas con HIV-1	78
3.3.2. El corte de PABP es inducido por la proteasa de HIV-1 y de otros retrovirus	79
3.3.3. La hidrólisis de PABP por HIV-1 y -2 PR ocurre simultáneamente a la de eIF4GI <i>in vitro</i>	79
3.3.4. Las proteasas de HIV-1 y -2 hidrolizan de forma directa PABP. Caracterización de los sitios de procesamiento	80
3.3.5. Efecto de HIV-1 PR y MBP-2A ^{pro} en la traducción de mRNAs exógenos en extractos de células HeLa	82
3.3.6. Efecto de HIV-1 PR y MBP-2A ^{pro} en la traducción de mRNAs exógenos y endógenos en extractos de células Krebs-2	84
3.3.7. HIV-1 PR inhibe la traducción dependiente de cola de poli(A) mediante el corte de PABP	86
3.3.8. Efecto de la hidrólisis de PABP en la traducción dirigida por el IRES de EMCV	87
3.4. Papel de eIF4G en la expresión del virus sindbis	91
3.4.1. Producción de SV recombinantes que expresan HIV-1 PR o 2A ^{pro} . Efecto en la síntesis de proteínas, en la replicación viral y en la producción de partículas infectivas	91
3.4.2. Efecto del corte de eIF4G en la traducción del RNA genómico de SV	95
3.4.3. Relevancia de la secuencia líder 26S en la traducción <i>cap</i> -independiente de los mRNAs subgenómicos del SV-GFP	97
3.4.4. Análisis de la secuencia líder 26S. Requerimiento de los mRNAs subgenómicos quimera de eIF4G para su traducción.	99
3.4.5. Efecto del corte de eIF4G en la traducción de mRNAs subgenómicos exógenos del SV transfectados en células de mamífero	100

DISCUSIÓN

4.1. Efecto de la hidrólisis de eIF4GI y eIF4GII por la proteasa 2A del PV en la traducción de mRNAs celulares y virales	103
4.2. Inhibición del <i>splicing</i> y de la exportación de RNAs desde el núcleo por la proteasa 2A del PV	106
4.3. La proteasa de HIV hidroliza PABP. Efecto en la traducción de mRNAs celulares y virales	109
4.4. Efecto de la hidrólisis de eIF4GI, eIF4GII Y PABP en la traducción de los RNAs del SV	112

CONCLUSIONES

Conclusiones	115
---------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía	117
---------------------	-----

ANEXO

Castello, A., Sanz, M.A., Molina, S. y Carrasco, L. (2006). Translation of Sindbis virus 26S mRNA does not require intact eukariotic initiation factor 4G. *J Mol Biol* **355**(5), 942-56.

Alvarez, E., Castello, A., Menendez-Arias, L. y Carrasco, L. (2006). HIV protease cleaves poly(A)-binding protein. *Biochem J* **396**(2), 219-26.

Castello, A., Alvarez, E. y Carrasco, L. (2006). Differential cleavage of eIF4GI and eIF4GII in mammalian cells. Effects on translation. *J Biol Chem* **281**(44), 33206-16.

Molina, S., Sanz, M.A., Madan, V., Ventoso, I., Castello, A. y Carrasco, L. (2007). Differential inhibition of cellular and Sindbis virus translation by brefeldin A. *Virology* **363**(2), 430-6.

Sanz, M.A., Castello, A. y Carrasco, L. (2007). Viral translation is coupled to transcription in Sindbis virus-infected cells. *J Virol* **81**(13), 7061-8.

Madan, V., Castello, A. y Carrasco, L. (2008). Viroporins from RNA viruses induce caspase-dependent apoptosis. *Cell Microbiol* **10**(2), 437-51.

Castelló, A., Franco, D., Berlanga, J.J., Álvarez, E., Wimmer, E., y Carrasco, L. Cleavage of eIF4GI, eIF4GII and PABP by viral proteases. Impact on *in vitro* translation of capped and uncapped mRNAs. Submitido.

ABREVIATURAS



ABREVIATURAS

2A^{pro}	Proteasa 2A
3C^{pro}	Proteasa 3C
aa/s	Aminoácido/s
ActD	Actinomicina D
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CBC	Complejo de unión a <i>cap</i>
CBP	Proteína de unión a <i>cap</i>
CVB3	Virus coxackie B3
Ci	Curio
Col.	Colaboradores
C-t	Dominio Carboxilo-terminal de eIF4G
CTD	Dominio Carboxilo-terminal de PABP
DMEM	Medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	ADN, ácido desoxirribonucleico
eIF	Factor de iniciación eucariótico
EMCV	Virus de la encefalomiocarditis
eRF	Factor de terminación eucariótico
FMDV	Virus de la fiebre aftosa
GFP	Proteína verde fluorescente
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HIV-PR	Proteasa del HIV
hpe	horas post-electroporación
hpi	horas post-infección
hpt	horas post-transfección
HRV	Rhinovirus humano
Hsp	Proteína de choque térmico
HTLV	Virus de la leucemia de células T humanas
IRES	Sitio de entrada interna del ribosoma
IV	virus de la gripe
L26S	Secuencia líder del mRNA subgenómico del SV
L49S	Secuencia líder del RNA genómico del SV
LL	Secuencia líder del mRNA de Luciferasa
Luc	Luciferasa
MBP	Proteína de unión a maltosa

MMTV	Virus del tumor mamario de ratón
MnK1	Quinasa activada por mitógenos 1
MoMLV	Virus Moloney de la leucemia de ratón
nsPs	Proteínas no estructurales
N-t	Dominio amino-terminal de eIF4G
Nt/s	Nucleótido/s
NTD	Dominio amino-terminal de PABP
mRNA	ARN (<i>RNA</i>) mensajero
PABP	Proteína de unión a la cola de poli(A)
Paip	Proteína de unión a PABP
PBS	Tampón salino fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Poli(A)	Poliadenosina
PTB	Proteína de unión a tramos de polipirimidinas
PV	Virus de la polio
RNA	ARN, ácido ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína
RRM	Dominio de reconocimiento de RNA
rRNA	ARN (<i>RNA</i>) ribosómico
RT	Retrotranscripción
siRNA	ARN (<i>RNA</i>) pequeño de interferencia
SIV	Virus de la inmunodeficiencia de simios
snRNA	ARN (<i>RNA</i>) pequeño nuclear
sPs	Proteínas estructurales
SV	Virus sindbis
Tet	Tetraciclina
tRNA	ARN (<i>RNA</i>) de transferencia
UTR	Región no traducida
VSV	Virus de la estomatitis vesicular

SUMMARY



RESUMEN EN INGLÉS (SUMMARY)

Viruses rely on the cellular machinery to synthesize their proteins, since this complex process requires numerous components that cannot all be encoded by viral genomes. Thus, viral mRNAs have to compete with host mRNAs for ribosomes and other components of the translation machinery. To achieve this goal, viruses have developed sophisticated mechanisms to maximize the translation of their own mRNAs by inhibiting host cell protein synthesis. Since the initiation of translation is a major step in the regulation of gene expression in eukaryotic cells, viruses usually target this step to block cellular mRNAs translation, thereby ensuring the synthesis of viral proteins. A number of viral proteases is involved in the proteolysis of translation initiation factors, such as eIF4G and PABP. Under these conditions the association of host mRNAs to ribosomes is severely impaired, whereas some viral mRNAs can interact efficiently with the translational machinery.

eIF4GI cleavage by poliovirus 2A^{pro} does not inhibit endogenous cellular translation. However, when eIF4GII is also cleaved by this protease, host protein synthesis is inhibited deeply. In fact, eIF4GII could support initiation of translation since the proteolysis of this factor in BHK cells correlates with the inhibition of the cellular mRNA translation. Nevertheless, translation of a *de novo* synthesized luciferase mRNA is blocked in concomitance with eIF4GI cleavage. Thus, eIF4GI could play a different role in the initiation of translation. On the other hand, PABP is hydrolyzed in HIV-infected cells. The cleavage of this protein is mediated directly by HIV-1 PR. Thus, we observe that 2A^{pro} as well as HIV-1 protease inhibit host protein synthesis using different mechanisms. 2A^{pro} cleaves both eIF4GI and eIF4GII, whereas HIV-1 PR proteolyzes eIF4GI and PABP. Both combinations impair cap- and poly(A)-dependent translation, while under these conditions picornavirus IRES-driven translation is enhanced or is not affected. Poliovirus 2A^{pro} and HIV-1 PR does not inhibit sindbis virus subgenomic mRNA translation, despite the fact that eIF4GI, eIF4GII and PABP are cleaved in infected cells. The Leader sequence from the subgenomic SV mRNA is necessary for this translational behaviour.

Finally, poliovirus 2A^{pro} impairs mRNA export from the nucleus to the cytoplasm. Notably, eIF4GI C-terminal product is accumulated in the nucleus. eIF4GI does not participate in mRNA export since depletion of this factor with siRNAs does not affect the distribution of mRNAs in the cell. Poliovirus 2A^{pro} also disables pre-mRNA splicing. In particular, the stage affected by the viral activity during the splicing is the liberation of 3' extreme of the intron. These findings could help to understand the mechanism by which poliovirus alters gene expression in infected cells.

INTRODUCCIÓN

1.1. LA INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN EN EUCARIOTAS.

La traducción es el proceso mediante el cual la información genética, contenida en el mRNA en tripletes de ribonucleótidos, se “traduce” a una secuencia de aminoácidos (aas) para dar lugar a las proteínas. Este complejo proceso está sometido a una estricta regulación fisiológica. La síntesis de proteínas se divide clásicamente en tres etapas, denominadas iniciación, elongación o polimerización y terminación, siendo la iniciación la fase más finamente regulada (Pain, V.M., 1996).

La iniciación de la traducción requiere de la participación de una serie de factores proteicos conocidos como factores de iniciación de la traducción (eIFs, *eukaryotic initiation factors*), que interactúan entre sí y con ácidos ribonucleicos tales como mRNAs, rRNAs o tRNAs (Prevot, D. y col., 2003). La regulación de este proceso se realiza principalmente modulando la actividad de ciertos eIFs, tales como eIF2 α , eIF4E o eIF4G (Ling, J. y col., 2005, Richter, J.D. y Sonenberg, N., 2005, Wek, R.C. y col., 2006). La iniciación de la traducción se puede dividir en cuatro fases: (1) selección del tRNA iniciador por eIF2 e interacción del complejo ternario GTP/eIF2/Met-tRNA_i y de otros factores con la subunidad ribosómica 40S para formar el complejo de preiniciación 43S. (2) Unión del complejo de preiniciación 43S al mRNA mediante el complejo eIF4F y la proteína de unión a la cola de poli(A) (PABP, **poly(A)-binding protein**). (3) Migración del complejo 43S a través de la región no codificante 5' (5'UTR, *untranslated region*) del mRNA hasta localizar un AUG en un contexto óptimo para iniciar la traducción, formando el complejo de preiniciación 48S. (4) Salida de los eIFs del complejo 48S y unión de la subunidad ribosómica 60S, para formar el ribosoma (80S). En la figura 1 se esquematizan los pasos básicos del proceso de iniciación de la traducción.

1.1.1. Formación del complejo de preiniciación 43S.

El factor heterotrimérico eIF2, formado por las subunidades α , β , y γ , une el Met-tRNA_i a la subunidad ribosómica 40S. Se requiere la participación de una molécula de GTP para estabilizar el complejo, dando lugar al **complejo ternario** GTP/eIF2/Met-tRNA_i (Pain, V.M., 1996, Sonenberg, N. y Dever, T.E., 2003). La subunidad 40S unida a eIF3 y eIF1A recluta el complejo ternario formando el **complejo de preiniciación 43S** (Figura 1). eIF2 α es fundamental para el control de la síntesis de proteínas. Así, su fosforilación en la Ser51 impide el recambio del GDP por GTP, proceso mediado por el factor de intercambio de nucleótidos eIF2B. En concreto, la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico (RE), la privación de aas o el RNA de doble cadena, producidas como consecuencia de la replicación viral, inducen la activación de quinasas que bloquean la iniciación de la traducción por la fosforilación de eIF2 α (Wek, R.C. y col., 2006).

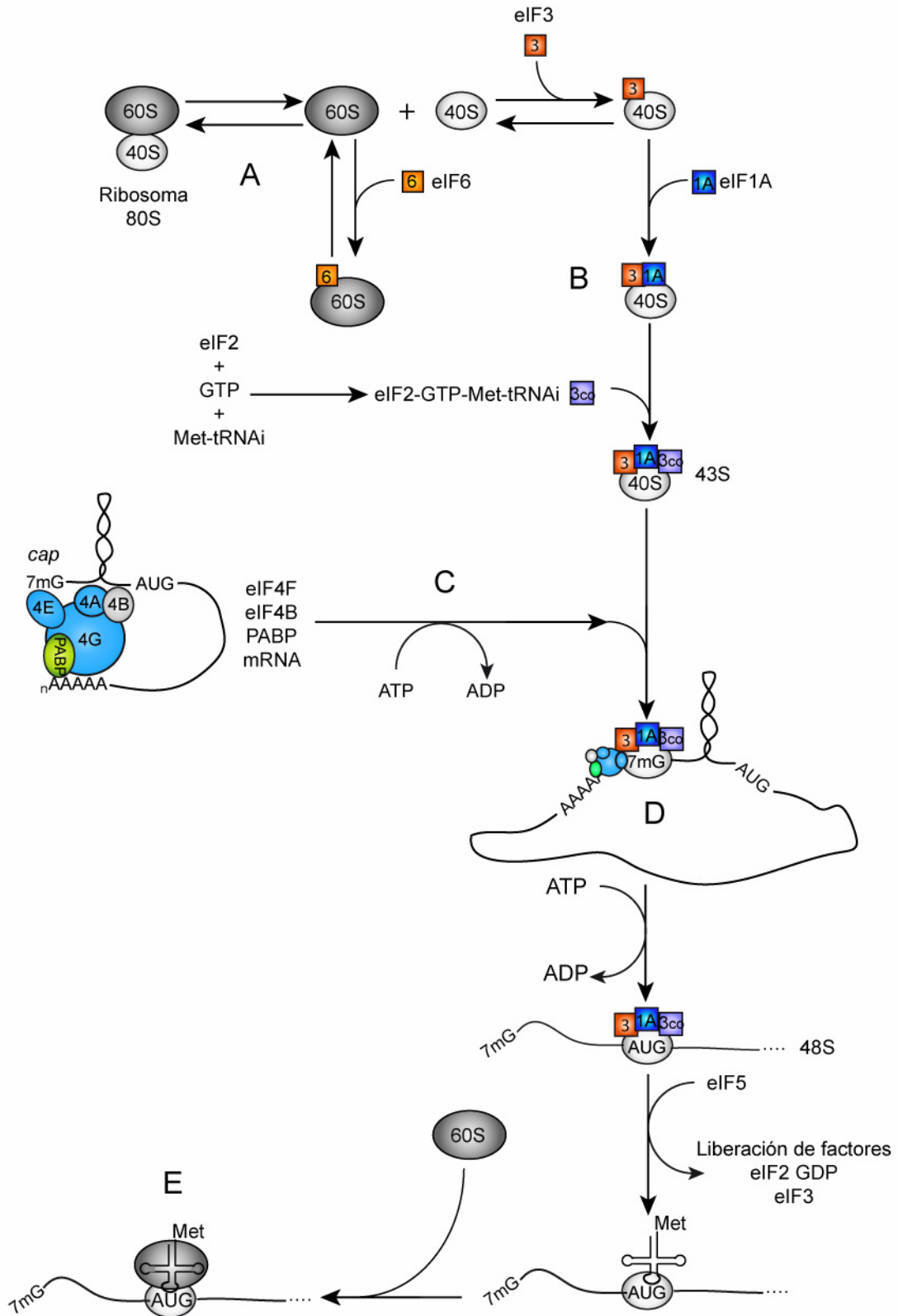


Figura 1. Mecanismo de iniciación de la traducción. A) Disociación de las subunidades 40S y 60S del ribosoma. B) Asociación de la subunidad ribosómica 40S con eIF3, eIF1A y el complejo ternario eIF2-GTP-Met-tRNAⁱ (3cc). C) Reconocimiento del mRNA por eIF4F. D) Unión de la subunidad ribosómica 40S al mRNA. E) Unión de la subunidad ribosómica 60S a la 40S asociada al mRNA. Adaptado de Gingras y col., 1999.

1.1.2. Unión del complejo de preiniciación 43S al mRNA.

Para que la iniciación de la síntesis de proteínas tenga lugar, el complejo de preiniciación 43S debe reconocer y unirse al mRNA. Esta reacción es mediada por los factores eIF4E, eIF4G, eIF4B, eIF4H, eIF3 y PABP (Figura 2) (Gingras, A.C. y col., 1999, Prevot, D. y col., 2003). La unión del complejo de preiniciación a la mayoría de los mRNAs eucarióticos se realiza a través del m^7GpppN (*cap*), presente en el extremo 5' del mRNA, y a la cola de poli(A), que se emplaza en su extremo 3'. El complejo citoplasmático de unión al *cap* se conoce como **eIF4F** y está formado por tres proteínas: eIF4E, responsable del reconocimiento y unión al *cap*; eIF4A, que es una helicasa de RNA dependiente de ATP y eIF4G, que interacciona con eIF4E y eIF4A y permite el reclutamiento de la subunidad ribosómica 40S mediante la interacción con eIF3 (Figura 3A y B) (Gingras, A.C. y col., 1999, Prevot, D. y col., 2003). Además, eIF4G interacciona con PABP, que se une a las colas de poli(A) de los mRNAs (Imataka, H. y col., 1998). La interacción simultánea de eIF4G con eIF4E y PABP induce una conformación circular al mRNA, que podría facilitar el reciclado de los ribosomas (Figura 3A) (Kahvejian, A. y col., 2001).

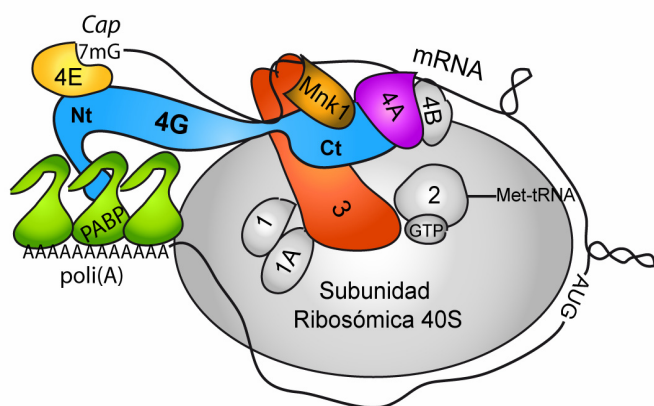


Figura 2. Complejo de iniciación de la traducción. Representación esquemática de las proteínas implicadas en la iniciación de la traducción como parte del complejo de iniciación de la traducción. En color se muestran los factores de iniciación que interactúan con eIF4G: eIF4E en amarillo; PABP en verde; eIF3 en naranja; eIF4A en morado; Mnk1 en marrón. La proteína andamio del complejo, eIF4G, se muestra en azul. En gris se muestra la subunidad ribosómica 40S y el resto de factores implicados en la iniciación de la traducción. Adaptado de Prevot y col., 2003 y de Schneider y Mohr, 2003.

Esta es una de las etapas más reguladas de la iniciación de la traducción. Así, en condiciones fisiológicas óptimas, la proteína quinasa activada por mitógenos (Mnk1, *mitogen-activated protein kinase*) fosforila eIF4E incrementando su capacidad para reconocer la estructura *cap* (Figura 3C). En cambio, los estímulos negativos tienen como consecuencia la inactivación de Mnk1 y la activación de las proteínas de unión a eIF4E (4E-BP, *4E-binding proteins*), que secuestran este factor (Richter, J.D. y Sonenberg, N., 2005). También eIF4G es fosforilado por distintas quinasas, incrementándose o reduciéndose su actividad (Ling, J. y col., 2005, Qin, H. y col., 2003, Raught, B. y col., 2000).

Ciertos mRNAs celulares y virales contienen secuencias 5'UTR ricas en estructura secundaria, conocidas como sitios de entrada interna del ribosoma (IRES, *internal ribosome entry site*), que permiten la asociación del complejo de preiniciación 43S con el mRNA sin

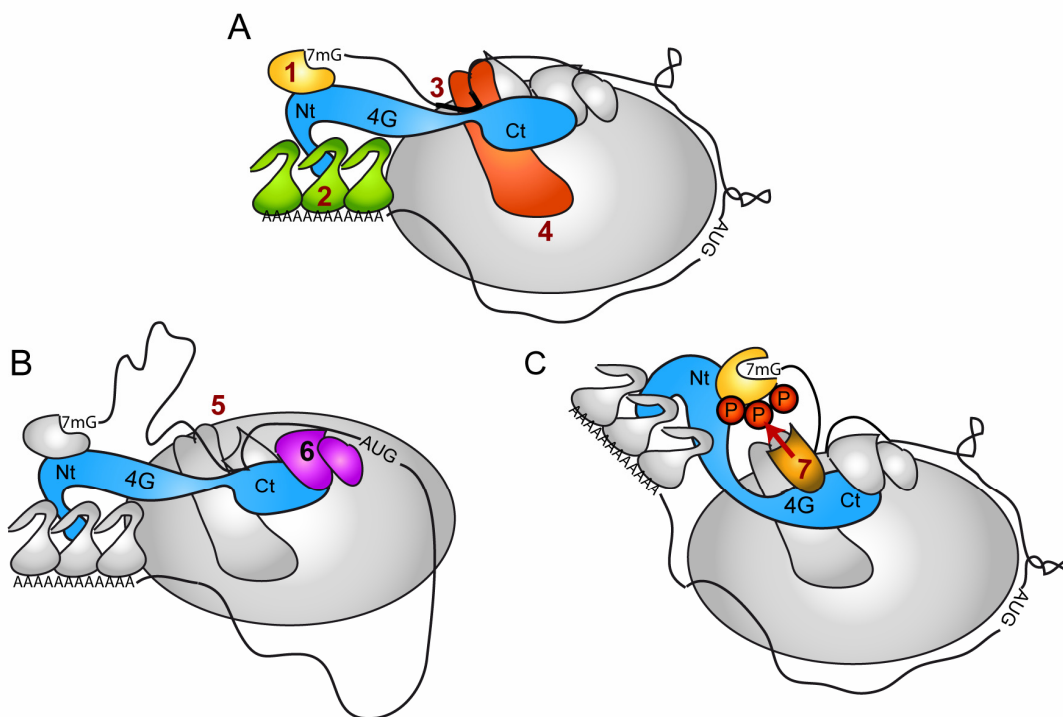


Figura 3. Funciones de eIF4G en el complejo de iniciación de la traducción. A) Sirve de puente entre el mRNA y la subunidad ribosómica 40S. La estructura *cap* y la cola de poli(A) son reconocidas por eIF4E y PABP (1 y 2, respectivamente). eIF4G también interactúa con el mRNA mediante sus RRM (3). La subunidad ribosómica 40S se asocia al mRNA mediante la interacción entre eIF3 y eIF4G (4). B) eIF4G, como parte del complejo de iniciación, participa en el avance de la subunidad ribosómica 40S por el RNA en busca de un AUG en contexto óptimo para iniciar la traducción (5) (*Scanning*). Durante el proceso, eIF4A y eIF4B eliminan la estructura secundaria (6) (*unwinding*). C) Mnk1 interactúa con eIF4G. En el entorno de eIF4E, Mnk1 fosforila eIF4E aumentando su afinidad por el *cap* (7).

mediación de la estructura *cap* (Martinez-Salas, E. y Fernandez-Miragall, O., 2004). Sin embargo, muchos de estos mRNAs sí que emplean la cola de poli(A) para iniciar su traducción (Michel, Y.M. y col., 2001, Svitkin, Y.V. y col., 2001).

1.1.3. Migración del complejo de preiniciación 43S a través del mRNA.

Una vez que el complejo de preiniciación 43S se ha unido al mRNA por la estructura *cap*, progresa a lo largo de la 5'UTR según el modelo de *scanning* (Kozak, M., 1989). En el transcurso de la migración, eIF4A y eIF4B eliminan la estructura secundaria de la 5'UTR, permitiendo el avance del complejo de 43S hacia el codón de iniciación de la traducción (Figura 3B) (Naranda, T. y col., 1994). Los factores eIF1 y eIF1A son importantes para que la subunidad ribosómica 43S se sitúe de forma adecuada sobre el codón de iniciación, **formando el complejo de preiniciación 48S** (Figura 1) (Pestova, T.V. y col., 1998). Además, estos factores podrían orientar el tRNA y el mRNA para que adopten la conformación correcta (Pestova, T.V. y Hellen, C.U., 2001).

1.1.4. Unión de la subunidad ribosómica 60S al complejo de preiniciación.

El factor eIF5 interacciona específicamente con eIF2 y eIF3, y promueve la hidrólisis del GTP del complejo ternario (Asano, K. y col., 2000, Asano, K. y col., 2001a, Asano, K. y col., 2001b, Chakrabarti, A. y Maitra, U., 1991). Este proceso tiene como consecuencia la liberación de los eIFs asociados con el complejo de preiniciación 48S por una pérdida de afinidad por la subunidad ribosómica 40S. La hidrólisis del GTP se produce en respuesta al correcto apareamiento entre el anticodón del Met-tRNA_i y el codón de iniciación presente en el mRNA (Huang, H.K. y col., 1997). El factor eIF2 se libera asociado a GDP, que para ser de nuevo funcional requiere que el complejo pentamérico eIF2B intercambie el GDP por GTP. Una vez los eIFs han abandonado la subunidad ribosómica 40S tiene lugar la unión de la subunidad 60S, quedando el Met-tRNA_i localizado en el sitio P, comenzando entonces la fase de elongación. Se ha descrito que el factor eIF5B es esencial para el ensamblaje del ribosoma (Pestova, T.V. y col., 2000).

1.2. EL FACTOR DE INICIACIÓN DE LA TRADUCCIÓN 4G (eIF4G).

1.2.1. La familia de factores eIF4G.

Se ha caracterizado y clonado el factor eIF4G de distintas especies, tales como las levaduras *S.cerevisiae* y *S.Pombe* (Goyer, C. y col., 1993), *Drosophila* (Zapata, J.M. y col., 1994), trigo (Browning, K.S., 1996) y humano (Gradi, A. y col., 1998a, Yan, R. y col., 1992). Existen dos formas de eIF4G en trigo (eIF4G e iso-eIF4G), *S. Cerevisiae* (TIF4631 y TIF4632) y humano (eIF4GI y eIF4GII); que presentan una identidad de secuencia moderada (46% en humanos y 53% en levaduras). Ambas formas se consideran homólogos funcionales ya que muestran actividades bioquímicas similares (Figura 4) (Prevot, D. y col., 2003).

Además se han descrito 5 isoformas de eIF4GI. Todas las variantes difieren en la extensión de su extremo amino-terminal (N-t) y se producen porque el mRNA de eIF4GI puede transcribirse a partir de 3 promotores distintos (α , β y γ) y, además, es sometido a *splicing* alternativo (Byrd, M.P. y col., 2005). Las diferentes isoformas de eIF4GI poseen distinta capacidad de soportar la traducción, siendo las más eficaces las que contienen el extremo N-t íntegro (Coldwell, M.J. y Morley, S.J., 2006).

Otro miembro de esta familia de factores es la proteína NAT1/DAP5/p97, que presenta una expresión ubicua y abundante en diferentes tejidos y líneas celulares (Imataka, H. y col., 1997, Yamanaka, S. y col., 1997). Esta proteína presenta una homología del 30% con la región Ct de eIF4GI y contiene los sitios de unión con eIF4A y eIF3. Sin embargo, no posee la capacidad de interactuar con eIF4E y PABP (Figura 4). Por ello, se propuso que la función de esta proteína podía estar asociada a la inhibición de la traducción dependiente de *cap*, dada su capacidad de unir eIF3 pero no eIF4E y PABP (Imataka, H. y col., 1997). Más recientemente se

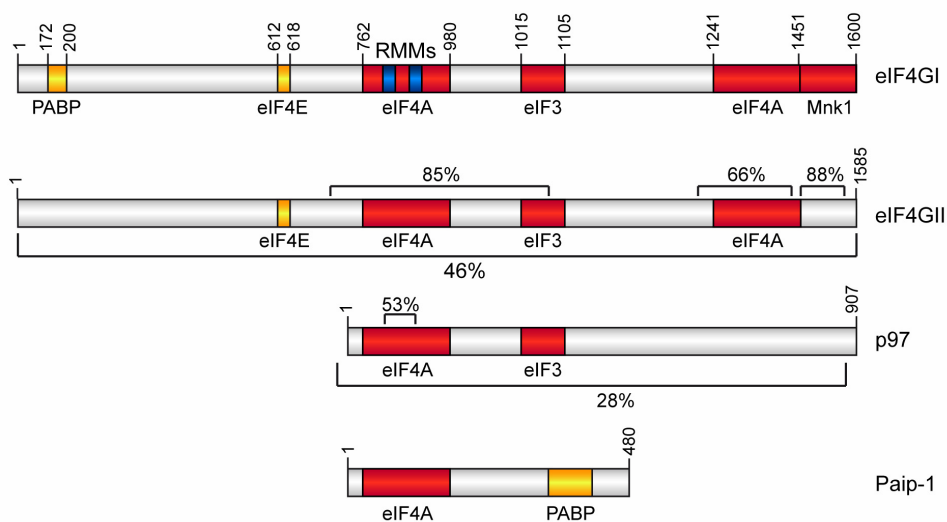


Figura 4. Familia de eIF4G en mamíferos. Representación esquemática de los miembros de la familia eIF4G: eIF4GI, eIF4GII, p97/DAP-5/NAT-1 y Paip-1; remarcando sus dominios de interacción con otras proteínas. Los sitios de interacción presentes en el extremo N-t de eIF4GI se muestran en amarillo, mientras que los presentes en la porción Ct están señalados en rojo. Los dominios de interacción con RNA (RRMs) se muestran en azul. Adaptado de Prevot y col., 2003.

ha descrito que este factor podría participar en la síntesis de proteínas en situaciones de estrés celular (Lewis, S.M. y col., 2007). Además, NAT1/DAP5/p97 es proteolizado por la caspasa-3 dando lugar a un producto de menor tamaño, conocido como p86, que podría mantener la traducción independiente de *cap* durante la apoptosis (Henis-Korenblit, S. y col., 2000, Henis-Korenblit, S. y col., 2002, Hundsdoerfer, P. y col., 2005). De hecho, se ha propuesto que el mRNA de NAT1/DAP5/p97 posee un IRES en su 5'UTR que aumenta su traducibilidad durante la apoptosis o el estrés grave (Nevins, T.A. y col., 2003).

La proteína de interacción con PABP1 (Paip-1, *PABP-interacting protein*) y DUG (*death-upregulated gene*) poseen un cierta homología con el dominio central de eIF4GI. De hecho, se ha descrito que estas proteínas pueden interaccionar con eIF4A *in vitro* (Craig, A.W. y col., 1998, Goke, A. y col., 2002).

1.2.2. Estructura y función de eIF4G.

El factor eIF4G se aisló inicialmente como parte de un complejo poliproteico denominado eIF4F. La adición de este complejo a extractos de células infectadas con el virus de la polio (PV) restaura la traducción (Tahara, S.M. y col., 1981). El complejo eIF4F está formado por eIF4G, eIF4E y eIF4A y media la unión del complejo de preiniciación 43S al *cap* de los mRNAs (Gingras, A.C. y col., 1999). Por tanto, eIF4G participa en la iniciación de la traducción como una proteína de ensamblaje que coordina la disposición de los componentes del complejo eIF4F y PABP para establecer un puente molecular entre el mRNA y la subunidad ribosómica 40S (Figura 3A).

eIF4G es hidrolizado por las proteasas de ciertos picornavirus (Lloyd, R.E., 2006). Usando estas proteasas virales en análisis bioquímicos y funcionales se ha logrado determinar el papel de cada dominio del factor en la iniciación de la traducción (Lamphear, B.J. y col., 1995). eIF4G dispone de dos dominios funcionales: i) Su parte N-t interacciona con eIF4E y PABP. En consecuencia, esta porción del factor es capaz de unir el mRNA por la interacción de eIF4E con el *cap* y de PABP con la cola de poli(A) (Figura 4) (Imataka, H. y col., 1998, Mader, S. y col., 1995). ii) El dominio C-t (carboxilo-terminal) dispone de un sitio de interacción con eIF3, por tanto, puede reclutar la subunidad ribosómica 40S por mediación de eIF3. El dominio C-t de eIF4G contiene además dos sitios independientes de interacción con eIF4A, el otro integrante del complejo eIF4F (Imataka, H. y Sonenberg, N., 1997, Korneeva, N.L. y col., 2000). Además, esta porción del factor contiene dos motivos de reconocimiento de RNA (RRM, *RNA-recognition motif*) (Goyer, C. y col., 1993). Se ha descrito que el dominio C-t de eIF4GI interacciona con Mnk1, proteína implicada en fosforilar eIF4E para incrementar su capacidad para reconocer el *cap* (Figura 4) (Pyronnet, S. y col., 2001). Por último, este dominio posee tres sitios de fosforilación en respuesta a suero, de modo que la actividad de eIF4G podría estar modulada por mitógenos (Raught, B. y col., 2000).

La interacción entre eIF4E y eIF4G determina la capacidad de la maquinaria de síntesis de proteínas para reconocer la estructura *cap* de los mRNAs (Figura 3A). El dominio de interacción con eIF4E, presente en eIF4G, contiene la secuencia YDREFLL, muy conservada en los factores eIF4G de distintas especies. Además, los represores de la traducción dependiente de *cap* 4E-BP 1 y 2 contienen también este motivo (Mader, S. y col., 1995). Se ha descrito que la interacción entre eIF4E y eIF4G incrementa la afinidad del primero por el *cap* (Haghighat, A. y col., 1996, von Der Haar, T. y col., 2000).

eIF4A es una helicasa de RNA de cadena sencilla dependiente de ATP, que incrementa su actividad mediante la interacción con eIF4B (Altmann, M. y col., 1993, Rogers, G.W., Jr. y col., 2002). La función propuesta para esta proteína es eliminar la estructura secundaria entre el *cap* y el codón de iniciación, para facilitar la unión y la migración del complejo de preiniciación 43S por la región 5'UTR del mRNA (Figura 3B) (Gingras, A.C. y col., 1999). La interacción de eIF4A las dos posiciones descritas en eIF4G se produce de manera cooperativa (Korneeva, N.L. y col., 2000). Aún así, el dominio de unión con eIF4A más próximo al extremo C-t de eIF4G no es esencial para la función del factor (Morino, S. y col., 2000). La estequiometría entre eIF4A y eIF4G es 1:1, lo cual sugiere que una sola molécula de eIF4A podría interactuar simultáneamente con los dos sitios (Li, W. y col., 2001). La unión de eIF4G con eIF4A estimula su actividad helicasa de RNA (Oberer, M. y col., 2005).

La interacción de eIF3 y eIF4A con el dominio central de eIF4G ocurre de manera cooperativa (Korneeva, N.L. y col., 2000). eIF3 es un complejo poliprotéico (~11 subunidades) que se une con alta afinidad a eIF4G por su subunidad eIF3e, y a la subunidad ribosómica 40S

(Hinnebusch, A.G., 2006, LeFebvre, A.K. y col., 2006). Según se ha descrito, la unión de eIF3 con la subunidad 40S estabiliza la interacción del complejo ternario GTP/eIF2/Met-tRNA_i con el ribosoma. Además, la presencia de eIF3 impide el ensamblaje de la subunidad ribosómica 60S con la 40S (Hannig, E.M., 1995). En definitiva, eIF3 actúa como un puente molecular entre eIF4G y la subunidad ribosómica 40S (Figura 3A) (Hinnebusch, A.G., 2006).

eIF4G y PABP (Pab1p en levaduras) interactúan de forma directa en levaduras, plantas y mamíferos. El dominio de interacción con PABP está situado en el extremo N-t de eIF4GI (Imataka, H. y col., 1998). Esa región está conservada en eIF4GII, aunque la interacción entre PABP y esta forma eIF4G aún no ha sido demostrada. Sin embargo, este dominio difiere significativamente del de levaduras (Imataka, H. y col., 1998, Prevot, D. y col., 2003).

eIF4G también interactúa con proteínas virales como NS1 y PB2 del virus de la gripe (IV, *influenza virus*) o NSP3A del rotavirus. Así, NS1 y PB2 podrían permitir que los mRNAs del IV se asocien con los ribosomas de forma independiente de eIF4E, mientras que la proteína NSP3A podría sustituir funcionalmente a PABP (Aragon, T. y col., 2000, Burgui, I. y col., 2007, Piron, M. y col., 1998).

Además, eIF4G interactúa con numerosas proteínas que no están implicadas en la traducción. Se ha descrito que Dcp1 (*decapping protein 1*), proteína esencial en el proceso de eliminación de la estructura *cap* en la degradación de los mRNAs, se une a eIF4G en *S.cerevisiae* (Vilela, C. y col., 2000). Además, eIF4G interactúa con el complejo de unión a *cap* nuclear (CBC, *cap-binding complex*) formado por las proteínas CBP (*cap-binding protein*) 80 y CBP20, en células de mamífero (Fortes, P. y col., 1999, Lejeune, F. y col., 2004). También se ha descrito que la proteína de choque térmico 27 (Hsp27, *heat shock protein 27*) se une a eIF4GI (Cuesta, R. y col., 2000). No obstante, las implicaciones funcionales de estas interacciones en la síntesis de proteínas y en el metabolismo del RNA aún no están claras.

Durante la apoptosis eIF4GI y eIF4GII se hidrolizan por la caspasa-3. En concreto, eIF4GI es proteolizado en posiciones 492 y 1136 generando un producto N-t (N-FAG) que contiene el dominio de interacción con PABP; un producto central (M-FAG) que posee los sitios de interacción con eIF4E, eIF3 y eIF4A; y una porción C-terminal (C-FAG) que interactúa con eIF4A y Mnk1 (Figura 7) (Marissen, W.E. y col., 2000b). Se ha descrito que M-FAG podría mantener la síntesis de proteínas durante la apoptosis junto a NAT1/DAP5/p97 (Hundsdoerfer, P. y col., 2005). En cambio, los cortes producidos por la caspasa-3 en eIF4GII inducen la degradación del factor, lo que coincide temporalmente con la inhibición de la síntesis de proteínas celulares (Marissen, W.E. y col., 2000a).

1.3. LA PROTEÍNA DE UNIÓN A LA COLA DE POLI(A) (PABP).

La mayoría de los mRNAs eucarióticos presentan en su extremo 3' colas de poli(A). Esta estructura homopolimérica permite la unión específica de una batería de proteínas conocidas como PABP, que desempeñan un papel crucial en la síntesis y en la función biológica de las colas de poli(A) (Gallie, D.R., 1998). Se han descrito dos tipos de PABP: Las proteínas de unión a la cola de poli(A) citoplasmáticas (PABPC), que engloban a PABPC1, PABPC2 e iPABP, y que están implicadas en traducción y en la estabilidad de los mRNAs (Adam, S.A. y col., 1986, Sachs, A.B. y col., 1986). Por otro lado, la proteína de unión a la cola de poli(A) nuclear (PABPN1) está involucrada en la poliadenilación de los mRNAs en el núcleo (Figura 5) (Nemeth, A. y col., 1995, Sachs, A.B. y Kornberg, R.D., 1985).

1.3.1. Estructura de las formas de PABP citoplasmáticas.

La proteína PABPC contiene en su NTD (*N-terminal domain*) cuatro RRM, separados por secuencias cortas. Estos motivos están muy conservados en los miembros de la familia (Burd, C.G. y col., 1991, Dreyfuss, G. y col., 1988). Cada motivo es capaz de unir RNA, pero no son funcionalmente equivalentes (Kuhn, U. y Pieler, T., 1996). Se ha descrito que los RRM₁₋₂ y RRM₃₋₄ componen dos unidades funcionales independientes (Deo, R.C. y col., 1999). En la secuencia del RRM₂ se halla el sitio de interacción con eIF4G (Imataka, H. y col., 1998). El NTD se une al CTD (*C-terminal domain*) mediante una región rica en prolinas y glutaminas. En el CTD se halla una secuencia de 75 aas que se pliega formando cuatro o cinco α -hélices (Figura 5) (Kozlov, G. y col., 2001, Siddiqui, N. y col., 2003). Se ha propuesto que el CTD interacciona con proteínas que contienen el motivo de unión a PABP o PAM (*PABP-interacting motif*), tales como Paip-1, Paip-2 y el factor de terminación de la traducción 3 (eRF3, *eukaryotic release factor 3*) (Cosson, B. y col., 2002, Khaleghpour, K. y col., 2001a, Khaleghpour, K. y col., 2001b, Kozlov, G. y col., 2001, Uchida, N. y col., 2002). Además, el CTD interacciona con eIF4B y media la oligomerización de PABP en las colas de poli(A) (Bushell, M. y col., 2000, Gallie, D.R., 1998, Le, H. y col., 1997). En adelante nos referiremos a PABPC como PABP.

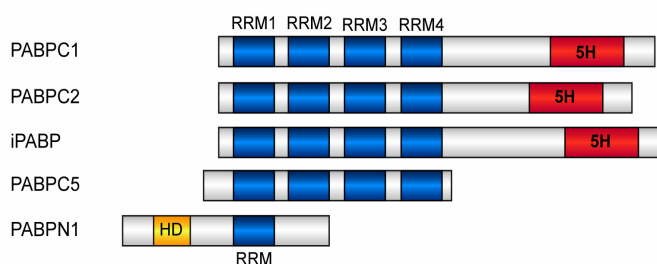


Figura 5. Estructura de las PABPs humanas. Esquema de las distintas PABPs presentes en células humanas. La alineación se ha realizado en función del primer RRM. Los RRMs se muestran en violeta, mientras que el dominio de 5 hélices (5H), común a las PABPs citoplasmáticas, se muestra en rojo. Por último, el motivo en hélice de PABPN1 se muestra en amarillo. Adaptado de Manus y col., 2003 y de Kuhn y Wahle, 2004.

1.3.2. Papel de PABP en la síntesis de proteínas.

Se ha descrito que un mRNA puede reclutar la maquinaria de traducción por su *cap* o por su cola de poli(A). De hecho, los mRNAs artificiales que poseen una u otra estructura inician su traducción de forma más eficaz que aquellos que carecen de ellas. Por ello, se ha considerado a PABP recientemente como un auténtico eIF (Kahvejian, A. y col., 2005). PABP se une a la cola de poli(A), presente en el extremo 3' de los mRNAs, y a eIF4G (Imataka, H. y col., 1998). A su vez, eIF4G interacciona con eIF4E, que se une al *cap* de los mRNAs presente en su extremo 5' (Mader, S. y col., 1995). Por tanto, ambos extremos del mRNA quedan unidos a eIF4G mediante eIF4E y PABP, formando un círculo cerrado. Se ha descrito que esta conformación favorece el reciclado ribosómico, por la proximidad física de los codones de iniciación y terminación de la traducción (Figura 6A) (Kahvejian, A. y col., 2001). Esta hipótesis está de

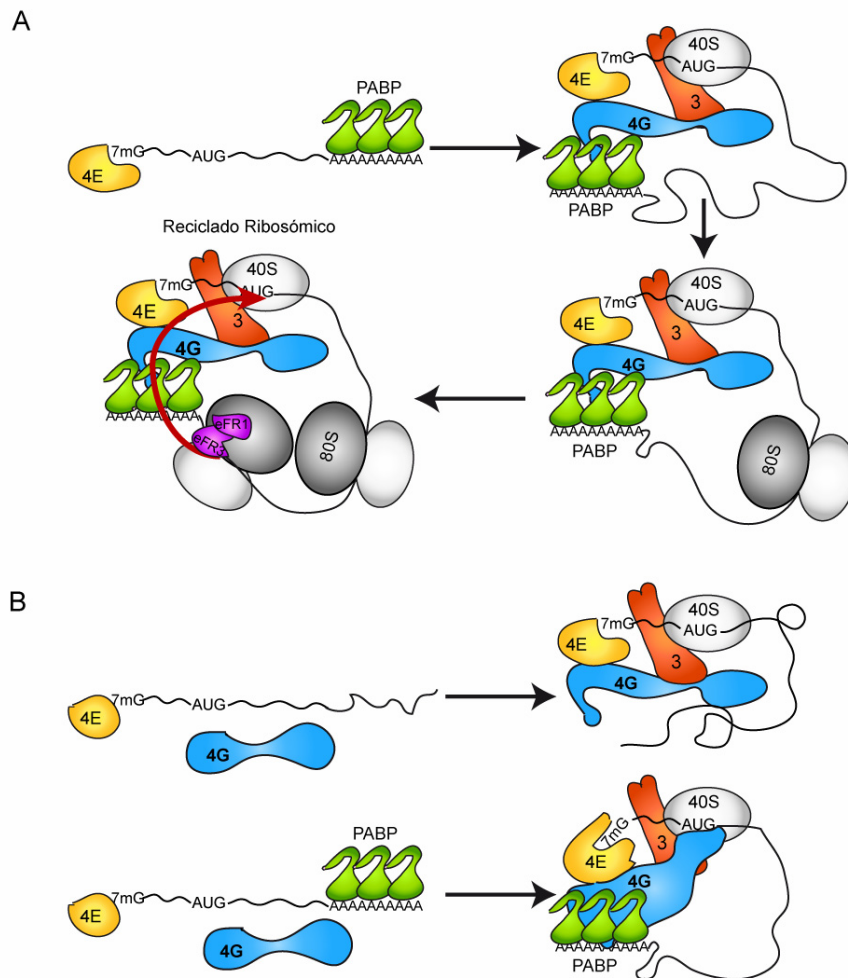


Figura 6. Contribución de PABP a la iniciación de la traducción. A) La interacción de PABP y eIF4E con eIF4G induce que el mRNA adopte una conformación circular. La proximidad de la estructura *cap* y de la cola de poli(A) podría potenciar el reciclado de los ribosomas para una nueva ronda de traducción. B) La interacción simultánea de PABP con eIF4G puede inducir cambios conformacionales en eIF4E o en el conjunto de eIF4F, que incrementen la afinidad de eIF4E por la estructura *cap* y de eIF4G por el mRNA. Adaptado de Mangus y col., 2000 y Kahvejian y col., 2005.

acuerdo con el hecho de que el *cap* y la cola de poli(A) contribuyen de forma sinérgica a la traducción de un mRNA (Michel, Y.M. y col., 2000). Sin embargo, en los últimos años se ha propuesto una explicación alternativa para esta propiedad, no siendo excluyente con el modelo del bucle cerrado. Según estos trabajos, la interacción de PABP con eIF4G podría inducir cambios conformacionales en el complejo, que incrementarían la afinidad de eIF4G por el RNA y la de eIF4E por el *cap* (Figura 6B) (Kahvejian, A. y col., 2005).

Además, PABP podría colaborar en la traducción por otros mecanismos. La interacción entre PABP y eRF3 aumenta la eficacia de la terminación de la traducción, lo que podría favorecer el reciclado de las subunidades ribosómicas para nuevas rondas de traducción (Figura 6A) (Cosson, B. y col., 2002, Uchida, N. y col., 2002). Otro fenómeno observado es que PABP incrementa la eficacia del ensamblaje entre las subunidades ribosómicas 40S y 60S (Munroe, D. y Jacobson, A., 1990). De hecho, la depleción de PABP en extractos de células Krebs-2 afecta tanto a la unión del complejo 43S al mRNA, como a la interacción de la subunidad ribosómica 60S con la 40S (Kahvejian, A. y col., 2005).

Durante la apoptosis, PABP es degradada de manera independiente del proteasoma. Este evento podría estar directamente relacionado con la inhibición de la traducción observada en las células apoptóticas (Marissen, W.E. y col., 2004).

1.4. MODIFICACIÓN DE LA MAQUINARIA DE TRADUCCIÓN Y TRANSCRIPCIÓN POR PROTEASAS VIRALES.

Los virus han desarrollado estrategias para expresar un número elevado de proteínas minimizando el tamaño y la complejidad de su genoma. Así, el PV expresa más de 20 polipéptidos diferentes a partir de un único RNA genómico de ~8 kb (Semler, B.L. y Wimmer, E., 2002). Lo mismo ocurre con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), que produce 15 proteínas a partir de un RNA genómico de ~10 kb. Para lograr una optimización tal de la información genética, los diferentes virus emplean mecanismos que van desde el *splicing* alternativo de sus RNAs, hasta la modificación post-traducciona de los polipéptidos virales por proteólisis (Purcell, D.F. y Martin, M.A., 1993, Semler, B.L. y Wimmer, E., 2002).

En el caso del PV, las proteasas 2A y 3C hidrolizan la poliproteína resultante de la traducción del RNA genómico para dar lugar a las proteínas funcionalmente activas. Además, hay ciertas formas intermedias de procesamiento que poseen una actividad diferente a la de sus productos (Ej.: 3CD respecto a 3C y 3D del PV) (Semler, B.L. y Wimmer, E., 2002). No obstante, la expresión de las proteínas del HIV depende tanto del *splicing* alternativo de su RNA genómico, como de la proteólisis mediada por su proteasa (HIV-PR), codificada por el gen *pol* (Purcell, D.F. y Martin, M.A., 1993).

Aunque la actividad de las proteasas virales parecía estar restringida a la proteólisis de los precursores poliproteicos del virus, en los últimos años se ha observado que también están

implicadas en hidrolizar ciertos factores celulares. De hecho, se ha relacionado el corte de algunas de estas proteínas con la modificación de la expresión génica celular y viral (Lloyd, R.E., 2006, Ohlmann, T. y col., 2002, Ventoso, I. y col., 2001, Weidman, M.K. y col., 2003).

1.4.1. Proteolisis de eIF4G por proteasas virales.

En 1982 Etchison y col. observaron que la proteína p220 (nombre asociado a eIF4GI) estaba hidrolizada en los extractos procedentes de células infectadas con el PV (Etchison, D. y col., 1982). Años después se identificó a la proteasa 2A (2A^{pro}) del PV como el agente causal de la proteolisis (Krausslich, H.G. y col., 1987). Estos autores relacionaron el corte de eIF4GI con la inhibición de la síntesis de proteínas observada en las células infectadas con el PV (Etchison, D. y col., 1982, Krausslich, H.G. y col., 1987). Poco después, se determinó que eIF4GI era un sustrato común para las proteasas de distintos picornavirus, como la 2A del HRV (*human rhinovirus*) y del coxackievirus B3 (CVB3) o la proteína L del virus de la fiebre aftosa (FMDV, *foot and mouth disease virus*) (Devaney, M.A. y col., 1988, Lloyd, R.E. y col., 1988). Las proteasas 2A de PV, HRV y CVB3 cortan eIF4GI en la posición 681 (Figura 7). En cambio, L^{pro} del FMDV corta este factor entre los aas 674-675. El hecho de que estas proteasas hidrolicen eIF4GI en posiciones tan próximas sugiere que el corte se produce en una región expuesta de la proteína. La proteasa 3C (3C^{pro}) del FMDV también hidroliza eIF4GI, dando lugar a unos productos distintos a los obtenidos con L^{pro} (Belsham, G.J. y col., 2000). Por otro lado, se ha observado que cuando eIF4GI está unido a eIF4E es más susceptible al corte por las proteasas de picornavirus (Bovee, M.L. y col., 1998, Haghghat, A. y col., 1996, Ohlmann, T. y col., 1997). Este dato apoya la hipótesis de que la unión entre eIF4E y eIF4G induce cambios conformacionales en ambas proteínas (Gross, J.D. y col., 2003, Pestova, T.V. y Hellen, C.U., 2003). Sin embargo, la rotura de eIF4GI durante la infección del PV no se correlaciona temporalmente con la inhibición de la síntesis de proteínas celulares (Bonneau, A.M. y

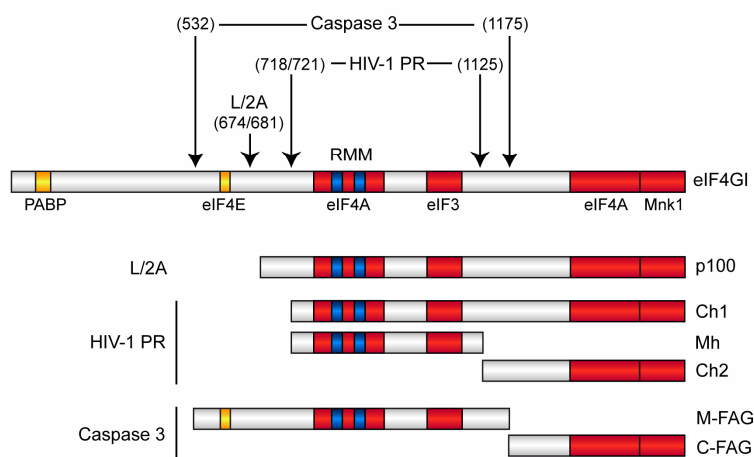


Figura 7. Diagrama de los sitios de proteólisis de eIF4GI. Esquema de eIF4GI en el que se muestran los sitios de interacción con proteínas celulares, indicándose los sitios concretos en los que este factor es hidrolizado por las proteasas L de FMDV, 2A de PV, HIV-1 PR y por la caspasa-3. En la parte inferior se esquematizan los productos de corte C-t generados por cada proteasa. Adaptado de Prevot y col., 2003.

Sonenberg, N., 1987, Irurzun, A. y col., 1995, Keiper, B.D. y Rhoads, R.E., 1997, Perez, L. y Carrasco, L., 1992).

Las proteasas 2A del PV y del HRV también proteolizan eIF4GII, aunque con una cinética más lenta que la de eIF4GI. De hecho, al igual que ocurre durante la apoptosis, en las células infectadas con estos virus el silenciamiento de la traducción celular correlaciona con el corte de eIF4GII (Gradi, A. y col., 1998b, Svitkin, Y.V. y col., 1999). Más recientemente, se ha descrito que eIF4GII también es un sustrato para la proteasa L del FMDV (Gradi, A. y col., 2004).

La hidrólisis de eIF4GI no sólo se restringe a las células infectadas con picornavirus. También se ha observado en células CD4+ infectadas con el HIV tipo 1 (HIV-1). Esta proteólisis, que es mediada por HIV-1 PR, correlaciona con la inhibición de la síntesis de proteínas (Ventoso, I. y col., 2001). Así, HIV-1 PR inhibe la iniciación de la traducción dependiente de la estructura *cap* debido al corte de eIF4GI (Ohlmann, T. y col., 2002, Perales, C. y col., 2003, Ventoso, I. y col., 2001). La hidrólisis del factor ocurre en dos posiciones alejadas (718/721 y 1125) (Figura 7) (Ventoso, I. y col., 2001). Sin embargo, HIV-1 PR no proteoliza eIF4GII (Ohlmann, T. y col., 2002). En un trabajo más reciente, Álvarez y col. han caracterizado que el corte de eIF4GI es extensible para otras proteasas de retrovirus, como la del HIV tipo 2 (HIV-2), del SIV (*simian immunodeficiency virus*), del MoMLV (*Moloney mouse leukemia virus*), del MMTV (*mouse mammary tumor virus*) y del HTLV-1 (*human T-cell leukemia virus type1*). Además, todas las proteasas de retrovirus testadas cortaron eIF4GII, salvo HIV-1 PR y HIV-2 PR (Alvarez, E. y col., 2003). Recientemente se ha descrito que en la infección con ciertos calicivirus se produce la inhibición de la síntesis de proteínas paralelamente al corte de eIF4GI y eIF4GII. Los productos de corte observados en estas células difieren de los obtenidos con las proteasas de picornavirus y retrovirus (Willcocks, M.M. y col., 2004). El hecho de que eIF4G sea sustrato de proteasas de virus tan distintos sugiere la existencia de un mecanismo común para regular la síntesis de proteínas en las células infectadas.

1.4.2. Papel del corte de eIF4G en la iniciación de la traducción dependiente de *cap* y en la iniciación interna.

Se ha sugerido que el corte de eIF4G por distintas proteasas virales tiene como consecuencia la inhibición de la traducción dependiente de *cap* (Etchison, D. y Smith, K., 1990, Ventoso, I. y col., 2001). Posteriormente se ha propuesto que también podría inhibir la traducción dependiente de la cola de poli(A) (Keiper, B.D. y Rhoads, R.E., 1999, Michel, Y.M. y col., 2001, Svitkin, Y.V. y col., 2001). Estos efectos se explican por el hecho de que el corte de eIF4G por las proteasas virales produce la separación de la región que interacciona con eIF4E y PABP de la que lo hace con eIF3, lo que se resume en la disociación de la capacidad de

reconocer el mRNA de la de reclutar la subunidad ribosómica 40S (Figura 8) (Prevot, D. y col., 2003). No obstante, la traducción de los mRNAs asociados con la maquinaria de traducción parece ser menos sensible al corte de eIF4G (Novoa, I. y Carrasco, L., 1999).

La rotura de eIF4G no inhibe la traducción de los RNAs de picornavirus (Ziegler, E. y col., 1995a, Ziegler, E. y col., 1995b). Esto es debido a que estos RNAs poseen IRES en su 5'UTR, que reclutan la maquinaria de traducción sin la participación de eIF4E (Martinez-Salas, E. y Fernandez-Miragall, O., 2004, Prevot, D. y col., 2003). No obstante, los IRES de picornavirus requieren, al menos, la porción C-t de eIF4G para iniciar su traducción (Ziegler, E. y col., 1995a, Ziegler, E. y col., 1995b). De hecho, el producto C-t, que contiene los dominios de interacción con eIF4A y eIF3, es suficiente para promover la iniciación interna (Figura 8) (Borman, A.M. y col., 1997, Ohlmann, T. y col., 1996). La región de eIF4G que contiene los RRM es la porción mínima para unirse directamente al IRES del EMCV (*Encephalomyocarditis virus*) (Pestova, T.V. y col., 2000). Por otro lado, la región mínima de

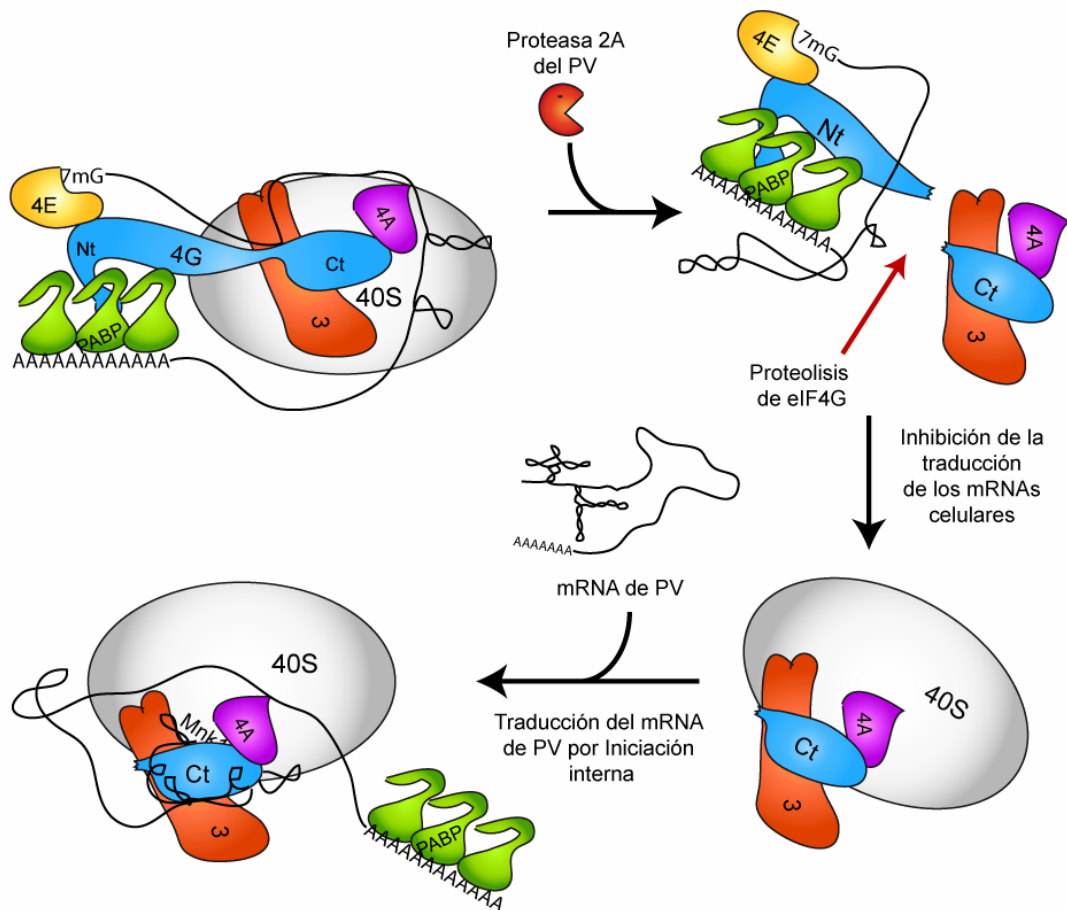


Figura 8. Inhibición de la traducción en células infectadas por PV. Traducción del IRES de PV. Durante la infección con ciertos picornavirus, como el PV, eIF4G es hidrolizado por proteasas virales. En el caso del PV, 2A^{pro} proteoliza eIF4G dando lugar a dos productos, eIF4G1-N-t y eIF4G1-Ct o p100. La escisión de eIF4G impide la iniciación *cap*-dependiente de los mRNAs celulares. El fragmento p100 es capaz de unirse directamente a los IRES de picornavirus, promoviendo la iniciación interna. Los colores con que se muestra cada factor de iniciación responden al código de color establecido en la figura 2. Adaptado de Prevoty col., 2003 y de Schneider y Mohr, 2003.

eIF4G para iniciar la traducción interna comprende la porción central generada por la caspasa-3 (M-FAG), que incluye uno de los dominios de interacción con eIF4A y el sitio de unión a eIF3 (Figura 7) (De Gregorio, E. y col., 1998;1999).

1.4.3. Proteolisis de PABP por proteasas virales.

PABP se hidroliza durante la infección del PV y del CVB3 (Kuyumcu-Martinez, N.M. y col., 2002). El corte de esta proteína es mediado por 2A^{pro} y 3C^{pro}; sin embargo, 2A^{pro} lo hace de manera ineficaz *in vivo* e *in vitro* (Joachims, M. y col., 1999, Kuyumcu-Martinez, N.M. y col., 2002). Así, se ha propuesto la proteolisis de PABP como un nuevo mecanismo para inhibir la síntesis de proteínas (Kuyumcu-Martinez, N.M. y col., 2004). En contra de esta hipótesis, la hidrólisis de PABP en las células infectadas con el PV no correlaciona temporalmente con el silenciamiento de la traducción de los mRNAs celulares (Kuyumcu-Martinez, N.M. y col., 2002). La explicación que propone Kuyumcu-Martinez y col. para esta controversia es que 3C^{pro} hidroliza preferentemente la población de PABP asociada a la maquinaria de traducción y no la forma soluble (Kuyumcu-Martinez, N.M. y col., 2002). De este modo, la proteolisis de pequeñas cantidades de PABP puede afectar a la síntesis de proteínas. El corte de PABP por 3C^{pro} se produce entre el NTD y el CTD, en posiciones 413, 437 y 537, mientras que la proteasa 2A del CVB3 lo hace en posición 487 (Figura 9) (Kuyumcu-Martinez, N.M. y col., 2002). La proteína 3C^{pro} es capaz de inhibir eficazmente la traducción endógena presente en extractos de células HeLa no tratados con nucleasa. Más concretamente, el corte de PABP por 3C^{pro} induce una inhibición selectiva de la traducción dependiente de la cola de poli(A) (Kuyumcu-Martinez, N.M. y col., 2004). También se ha observado que PABP se hidroliza en las células infectadas con el FMDV, aunque se desconocen los sitios de procesamiento. No obstante, se ha propuesto que L^{pro} podría inducir esta proteolisis (Rodriguez Pulido, M. y col., 2007).

Más recientemente se ha observado que la proteasa 3C-like del norovirus (NoV), un calicivirus, corta también PABP en los aas 413 y 537 (Kuyumcu-Martinez, M. y col., 2004). El hecho de que todas las proteasas que hidrolizan PABP lo hagan entre estas dos posiciones

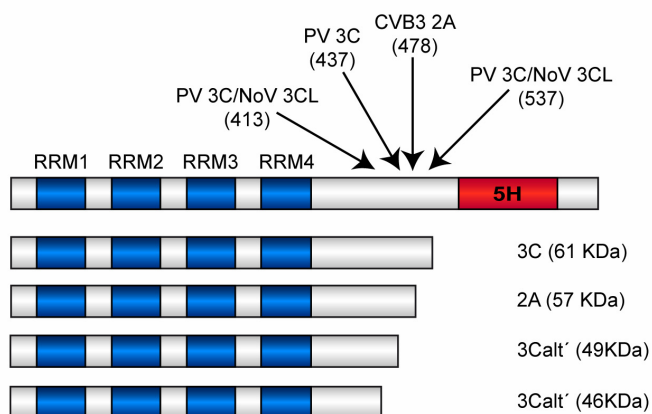


Figura 9. Proteolisis de PABP por proteasas virales. Representación esquemática de PABPC con sus dominios de interacción con proteínas celulares. Se especifican los sitios de corte para las proteasas 2A de cosackievirus B3 (CVB3 2A^{pro}), 3C^{pro} de PV y la proteasa 3C-like de norovirus (NoV 3CL). 3Calt y 3Calt', sitios alternativos de procesamiento de 3C^{pro} del PV y 3CL del NoV. En la parte inferior se esquematizan los productos de corte N-t resultantes. Adaptado de Kuyumcu-Martinez y col., 2002)

sugiere que ésta es una parte expuesta de la proteína. Además, esta región une el NTD con el CTD, de modo que el corte puede desacoplar funcionalmente ambos dominios (Lloyd, R.E., 2006).

1.4.4. Proteolisis de otros factores implicados en la traducción.

Se ha descrito que PTB (*polypyrimidine tract-binding protein*) actúa como un transactivador de la traducción interna dirigida por los IRES de picornavirus. De hecho, PTB interactúa directamente con el IRES del PV y se ha propuesto que podría actuar como una chaperona de RNA (Kolupaeva, V.G. y col., 1996, Song, Y. y col., 2005). La proteasa 3C del PV hidroliza PTB, inhibiendo la traducción dirigida por el IRES viral (Figura 10) (Back, S.H. y col., 2002). El PV requiere que los RNAs procedentes de la desencapsidación de los viriones se traduzcan para producir las proteínas necesarias para su replicación. Se ha propuesto que la proteasa 3C, como parte de la poliproteína viral sintetizada, hidroliza PTB inhibiendo la traducción del RNA del virus. De este modo, el RNA sería liberado para poder ser empleado como molde en la replicación por los complejos replicativos (Back, S.H. y col., 2002).

Por último, se ha observado que las subunidades a y b de eIF3 se proteolizan en las células infectadas con cepas citopáticas del FMDV (Rodríguez Pulido, M. y col., 2007). Sin embargo, se desconoce que repercusión podría tener en el contexto de la infección viral.

1.4.5. Interferencia de las proteasas de picornavirus con el núcleo celular.

Los picornavirus realizan su ciclo infectivo en el citoplasma celular. Sin embargo, se ha detectado la presencia de las proteasas virales en el núcleo de las células infectadas. En el caso del PV, 3C^{pro} accede al núcleo como parte del precursor 3CD^{pro}, ya que la secuencia de 3D contiene una señal de localización nuclear básica (NLS, *nuclear localization signal*) (Sharma, R. y col., 2004). Una vez en el núcleo el precursor 3CD^{pro} da lugar a sus productos 3C^{pro} y la polimerasa 3D. En cambio, el escaso tamaño de 2A^{pro} le permite acceder al núcleo por difusión a través del poro nuclear (Belov, G.A. y col., 2004). La expresión individual de estas proteasas en células en cultivo produce importantes daños en el tráfico de proteínas y en la transcripción (Weidman, M.K. y col., 2003).

Durante la infección con ciertos picornavirus se produce la inhibición de la transcripción de mRNAs celulares. Sin embargo, las RNA polimerasas I, II y III, aisladas de las células infectadas, muestran una actividad normal en ensayos *in vitro*, además de conservar el mismo perfil de peso molecular en SDS-PAGE (Apriletti, J.W. y Penhoet, E.E., 1978, Schwartz, L.B. y col., 1974). Estos resultados indican que estas proteínas no son alteradas como consecuencia de la infección. Se han descrito que las proteasas 2A y, especialmente, 3C del PV median diferentes cortes que afectan a distintos factores de transcripción, como la proteína de unión a la caja TATA (TBP, **TATA-binding protein**), TAF₁₁₀ (*TATA-binding protein-associated factor*), el

factor de transcripción IIIC (TFIIIC, *transcription factor* IIIC), TFIID y los activadores de la transcripción CREB y Oct-1 (Figura 10) (Banerjee, R. y col., 2005, Weidman, M.K. y col., 2003). La inactivación de estos factores podría dañar dramáticamente la transcripción de los RNAs celulares.

Además, el PV induce el corte proteolítico de Nup153 y p62 a tiempos tardíos de la infección (4,5 hpi) (Figura 10) (Gustin, K.E. y Sarnow, P., 2001;2002). Estas modificaciones son producidas directa o indirectamente por 2A^{pro} y terminan en la distorsión del poro nuclear, acompañado de un incremento de la permeabilidad de la membrana nuclear. Así, las proteínas celulares cambian su distribución en la célula (Belov, G.A. y col., 2004). Un efecto similar ha sido observado con cardiovirus como el EMCV (Lidsky, P.V. y col., 2006).

Finalmente, se ha descrito que la proteasa 2A del PV induce la hidrólisis de la gemina 3, proteína implicada en el ensamblaje de las snRNPs U (RNP, *ribonucleoprotein*). La rotura de este factor produce un descenso en la cantidad de snRNPs U, aunque aún se desconoce sus posibles repercusiones en el *splicing* de los pre-mRNAs (Almstead, L.L. y Sarnow, P., 2007).

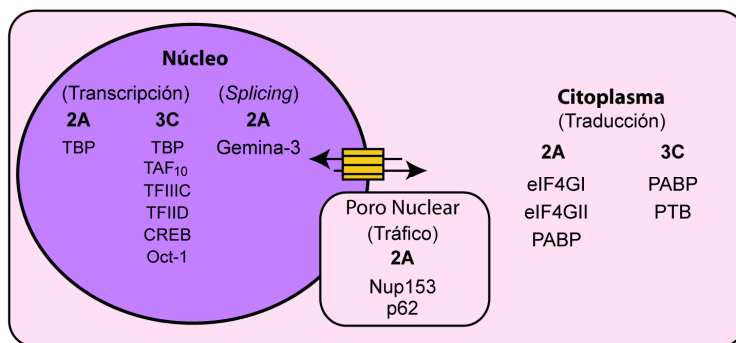


Figura 10. Modificación de la maquinaria celular por las proteasas 2A y 3C del PV. Dibujo esquemático de una célula eucariótica, donde se indican los procesos biológicos alterados por las proteasas 2A y 3C del PV (transcripción, *splicing*, tráfico de proteínas y la traducción). Además, se muestran los sustratos proteolizados por cada una de estas proteasas en cada caso.

OBJETIVOS

Empty box for objectives.

OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis doctoral han sido:

1. Estudiar el efecto del corte de los factores de eIF4GI y eIF4GII, por la proteasa 2A del virus de la polio, en la traducción de distintos mRNAs celulares y de picornavirus. Analizar la influencia del corte de estos factores en la traducción de mRNAs sintetizados *de novo* o presentes en el citoplasma celular. Comparar estos efectos con los obtenidos en un estado de carencia de eIF4GI y/o eIF4GII inducida por la transfección de RNAs de interferencia.
2. Determinar si la proteasa 2A del virus de la polio es capaz de alterar el transporte de RNAs del núcleo al citoplasma y el procesamiento (*splicing*) de los pre-mRNAs. Intentar definir cual es la causa de estos efectos y si el corte de eIF4G tiene alguna influencia en ellos.
3. Analizar la hidrólisis de PABP por la proteasa del HIV-1 y de otros retrovirus. Determinar si el corte llevado a cabo por estas proteasas es directo e identificar los sitios de corte. Comparar los efectos de la proteasa de HIV-1 y de la 2A del virus de la polio en la traducción de distintos mRNAs.
4. Estudiar el papel de eIF4G y PABP en la traducción de los mRNAs del virus sindbis. Determinar la secuencia del mRNA subgenómico que está implicada en la traducción independiente de eIF4E y PABP.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MANIPULACIÓN DE CÉLULAS BACTERIANAS

2.1.1. Bacterias.

Se utilizaron las siguientes cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*):

- **DH5 α** [F⁻, RecA1, hsdR17, (rK⁻, mK⁻), LacZY, argF, U169, supE44, thil, gyrA96, relA1] (Hanahan, D., 1983). Esta cepa se utilizó para la amplificación y purificación de los plásmidos descritos en este trabajo.

- **BL21 (DE3)**: estas bacterias derivadas de la cepa BL21 [F⁻, ompT⁻, rB⁻, mB⁻, recA⁺, lon⁻, dcm⁻] contienen insertado como probacteriófago el gen de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 bajo el control del promotor *lac UV5* (Studier, F.W. y Moffatt, B.A., 1986).

2.1.2. Medios de Cultivo para *E. coli*.

El crecimiento de *E.coli* se realizó en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con ampicilina (100 μ g/ml). Los cultivos de colonias en medio sólido se realizaron en el mismo medio suplementado con bacto-Agar (*Difco*) al 1,5% y ampicilina (100 μ g/ml). Para preparar bacterias competentes se crecieron en medio Phi-Broth. La composición de estos medios se describió en detalle por J. Sambrook y col. (Sambrook, J. y col., 2001).

2.1.3. Mantenimiento y crecimiento de bacterias.

De forma rutinaria, las células bacterianas se crecieron en medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) y se conservaron a -70° C en el mismo medio de crecimiento suplementado con glicerol al 20% (v/v).

2.1.4. Obtención de bacterias competentes.

Para obtener bacterias competentes se añadieron 50 μ l de bacterias *E.coli*, de la cepa DH5 α , procedentes de un cultivo crecido durante la noche en LB, a 19 ml de medio Phi-Broth. Se incubaron a 37° C con agitación fuerte hasta alcanzar un valor de absorbancia de 0,24 a 660 nm. Se añadió 2,5 ml a de este cultivo a 100 ml de medio Phi-Broth previamente calentado a 37° C y se dejaron crecer hasta un valor de absorbancia de 0,35 a 660 nm. Posteriormente se centrifugaron y se resuspendió el pellet en 4 ml de medio TfbII. Las bacterias se conservaron a -70° C en alícuotas de 200 μ l hasta su utilización.

2.1.5. Transformación de *E.coli* por choque térmico.

Se incubaron 50 μ l de bacterias competentes, previamente descongeladas, con el DNA transformante en hielo durante 20 min. Se realizó el choque térmico calentándolas durante 40 segundos a 42° C. Después de enfriarlas durante 5 min en hielo, se les añadió 1 ml de medio LB y se las incubó durante 1 hora a 37° C. Transcurrido ese tiempo, se recogieron las bacterias por

centrifugación (3 min a 5000 rpm) y se extendieron en una placa de LB-Agar suplementado con ampicilina (100 µg/ml). Por último, las placas se incubaron a 37° C durante toda la noche.

2.1.6. Obtención de DNA plasmídico.

Para aislar cantidades pequeñas de DNA con fines analíticos se utilizó el *kit* comercial *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. En procedimientos preparativos se empleó el *kit* comercial *Wizard Maxipreps* (Promega), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

2.2. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

2.2.1. Manipulación del DNA en procesos de clonación.

El tratamiento del DNA con los enzimas de restricción (*New England Biolabs*) se llevó a cabo según las recomendaciones del proveedor. El tiempo de digestión dependió del enzima utilizado y de la cantidad y pureza del DNA a digerir. Las ligaciones se realizaron empleando la ligasa de DNA del bacteriófago T4 (*New England Biolabs*) siguiendo los protocolos recomendados por la casa comercial.

2.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las reacciones estándar se realizaron en un volumen de 50 µl con el tampón suministrado por la casa comercial (Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, gelatina al 0,01% (p/v)), 0,5 µM de cada oligonucleótido iniciador, 200 µM de cada dNTP, 0,5-1 ng de DNA molde y 5 unidades de DNA polimerasa Taq (*Perkin Elmer*). El programa empleado dependió del tamaño del producto a amplificar y del grado de hibridación de los oligonucleótidos con el molde. Los productos de DNA obtenidos se purificaron en columnas *Wizard PCR preps* (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.2.3. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos empleados para construir los distintos plásmidos para las reacciones de PCR cuantitativa a tiempo real, se representan en la tabla 1.

2.2.4. Separación electroforética de DNA y RNA en geles de agarosa.

La separación del DNA se llevó a cabo en geles de agarosa del 0,7 al 2% (p/v), dependiendo del tamaño de los productos a separar. Las muestras se resuspendieron en tampón de carga para ácidos nucleicos (azul de bromofenol al 0,25%, xilén cianol al 0,25% y ficoll al 15%) y el electrolito empleado para la electroforesis fue el TAE 1X (Tris base 2M, ácido acético glacial al 5,7% y EDTA (pH 8) (TAE 50X)). Tras la separación del DNA se procedió a la tinción con bromuro de etidio 5 mg/ml del gel, para la posterior visualización de las bandas

resultantes en un transiluminador. En el caso de muestras de RNA el proceso se realizó del mismo modo, pero con la precaución de inactivar las RNasas presentes en los materiales y las soluciones. Para ello tratamos con H₂O₂ y etanol los soportes de electroforesis y utilizando soluciones autoclavadas.

Oligonucleótido	Secuencia (5' →3')
5' HIV PR Nde I	CGCGGATCCATATGCCTCAGATCACTCTTTGGC
5' HIV-PR Xba I	CGTCTAGAATGCCTCAGATCACTCTTTGGC
3' HIV PR BamH1	CGCGGATCCTTACTAAAAATTTAAAGTGCAACCAATCTG
5' SV-ApaI	GATGACGGGCCAGGTAGAC
3' SV- XbaI	GCGCGCTCTAGACTAGATCCGGTGG
5' NexoL26SGFP	CAACACCACCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
3' NexoL26SGFP	CCTTGCTCACCATGGTGGTGGTGGTGTGTTAG
5' SV Δ12-31	CTAAATAGTCAGCATACTACAACACCACC
3' SV Δ12-31	GGTGGTGTGTTGATGCTGACTATTTAG
5' SV Δ32-49	CATTTTCATCTGACTAATAATGGTGAGCAAGGGCGAG
3' SV Δ32-49	TGCTCACCATTATTAGTCAGATGAAATG
5' SV Δ12-49	CTAAATAGTCAGCATAATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
3' SV Δ12-49	TCCTCGCCCTTGCTCACCATTATGCTGACTATTTAG
nsP2- <i>forward</i>	GGAGGGGCTC CAGGCCGGACATCG
nsP2- <i>reverse</i>	GCTCCTCTTCTGGTATTCTTGGCG
C- <i>forward</i>	GAACGAGGACGGAGATGTCATCG
C- <i>reverse</i>	CAGCGCCACCGA GACTATCGC
Luc- <i>forward</i>	CCTTGATTGACAAGGATGGATGGC
Luc- <i>reverse</i>	CATCGTCGGGAAGACCTGCCACGCC

Tabla 1. Oligonucleótios. En la tabla se muestran los nombres y las secuencias de los nucleótidos empleados.

2.2.5. Extracción de DNA de geles de agarosa

Para purificar el DNA desde un gel de agarosa se procedió a la visualización y al corte de la banda, Después, las muestras se procesaron usando el kit comercial *Wizard PCR minipreps* (*Promega*) siguiendo las instrucciones del proveedor.

2.2.6. Plásmidos

Plásmidos derivados de pTM1.

- **pTM1.** Contiene el promotor para la RNA polimerasa del bacteriófago T7, seguido por la secuencia del IRES del EMCV, que dirige la traducción independiente de cap del gen que se sitúa detrás. Se requiere la expresión de T7 en las células transfectadas con estos plásmidos. Para ello, las células se infectaron con el virus de la vacuna recombinante que produce la RNA polimerasa del bacteriófago T7 (vvT7) como método para suministrar la polimerasa en *trans*. Por otro lado este plásmido puede ser utilizado en una reacción de transcripción *in vitro* usando la polimerasa T7 purificada (*Promega*).

- **pTM1-2A.** Este plásmido posee el gen *2A* de poliovirus tras el IRES del EMCV (Aldabe, R., 1995, Aldabe, R. y col., 1995a).

- **pTM1-2C.** Contiene la secuencia de 2C del PV (Aldabe, R., 1995).

- **pTM1-3C.** Codifica la proteína 3C del PV (Aldabe, R., 1995).

- **pTM1-HIV-1 PR.** Este plásmido contiene la secuencia de la proteasa de HIV-1 (Ventoso, I. y col., 2001).

- **pTM1-HIV-2 PR, pTM1-MMTV PR, pTM1-MoMLV PR, pTM1-HTLV-1 PR, pTM1-SIV.** Contiene el gen *pr* de HIV-2, MMTV, MoMLV, HTLV o SIV respectivamente (Alvarez, E. y col., 2003, Álvarez, E., 2004).

- **pTM1-Luc.** Codifica la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) (Álvarez, E., 2004).

Plásmidos derivados de pKSBluescript.

- **pKS.** (*Stratagene*) contiene el promotor de la RNA polimerasa del bacteriófago T7. Al igual que en el caso del pTM1, se requiere el aporte en *trans* de la polimerasa de T7 para conseguir expresión de genes heterólogos a partir de este plásmido en células de mamífero.

- **pKS-Luc.** Codifica el gen de la luciferasa (*Photinus pyralis*) (Barco, A. y col., 2000).

Plásmidos derivados del pT7.

- **pT7SVwt.** Plásmido de expresión en células de mamífero que contiene la secuencia del clon infectivo del SV (cDNA), precedida por el promotor de la RNA polimerasa del bacteriófago T7. Fue descrito previamente por M.A. Sanz y se utilizó como clon parental salvaje para generar las distintas variantes derivadas de SV (Sanz, M.A., 1998).

- **pT7SV-HIV-1 PR y pT7SV-2A.** Se realizó un producto de PCR usando los oligonucleótidos 5' HIV-PR Xba I y 3' HIV PR BamHI (tabla 1) y como molde el cDNA genómico de la cepa NL4.3. del HIV-1. El producto, que contenía la secuencia de la proteasa de HIV-1, se insertó en el plásmido intermediario pH3,2J usando las enzimas de restricción *XbaI/BamHI*. Posteriormente, se generó un nuevo producto digiriendo el plásmido resultante (pH3,2J-HIV-1 PR) con los enzimas de restricción *ApaI/XhoI*. Este DNA, que contenía el promotor subgenómico de SV seguido de la secuencia líder 26S y el gen *pr* de HIV-1, se insertó en el plásmido pT7SVwt procesado con las mismas enzimas de restricción (*ApaI/XhoI*).

- **pToto1101/Luc (SV-Luc).** Plásmido que contiene el cDNA del virus recombinante SV-Luc. Este plásmido fue amablemente proporcionado por C. Rice (Rockefeller University, NY) (Bick, M.J. y col., 2003).

- **pT7SV-GFP, pT7SV-GFPΔ11-31, pT7SV-GFPΔ31-49 y pT7SV-GFPΔ11-49.** Se amplificó por PCR un híbrido del promotor subgenómico y la secuencia líder 26S de SV con la secuencia de la proteína verde fluorescente (green fluorescent protein, GFP). Posteriormente, se emplearon los oligonucleótidos 5' SV-*ApaI* con 3' NexoL26SGFP y 5' NexoL26SGFP con 3'

SV-*XbaI*, en dos reacciones independientes de PCR, usando como moldes los plásmidos pT7SVwt y pEGFP-N1, este último amablemente cedido por I. Ventoso (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Madrid) (Ventoso, I. y col., 2006). El producto de fusión se generó en una tercera PCR usando los oligonucleótidos SV-*ApaI* y SV-*XbaI* y la mezcla de los fragmentos procedentes de la reacción anterior. Finalmente, el producto digerido con las enzimas de restricción *ApaI/XbaI* se insertó en el plásmido pT7SVwt, procesado de la misma manera, dando lugar al pT7SV-GFP. Para obtener los distintos mutantes de delección en la secuencia líder 26S de SV, se emplearon oligonucleótidos específicos que omitían las secuencias que se querían eliminar (5' SV-*ApaI*, 3' SV-*XbaI*, 5' SV L Δ 12-31, 3' SV L Δ 12-31, 5' SV L Δ 32-49, 3' SV L Δ 32-49, 5' SV L Δ 12-49, 3' SV L Δ 12-49; tabla 1) en reacciones de doble PCR, tomando como molde el plásmido original pT7SV-GFP. De esta forma se obtuvieron los plásmidos pT7SV-GFP Δ 11-31, que carece los nucleótidos (nts) del 11-31 de la 5'UTR del segundo mRNA subgenómico; pT7SV-GFP Δ 31-49 que no contiene los nts del 31-49; y pT7SV-GFP Δ 11-49 al que se eliminó la mayor parte de la secuencia líder 26S (del nt 11 al 49) que precede a GFP.

- **pT7-LLuc-Luc**, **pT7-L26-Luc** y **pT7-C-Luc**. Estos plásmidos son derivados del pT7SVwt y dan lugar a RNAs con secuencias del SV que codifican la luciferasa de luciérnaga (Sanz, M.A. y col., 2007). La transcripción in vitro de estos plásmidos usando la polimerasa T7 da lugar a los mRNAs LL-Luc, L26S-Luc y L26S-C-Luc respectivamente.

Plásmidos de expresión en bacterias.

- **pGEX-2T-PABP1**. Contiene el gen de la PABP1 humana, salvo la secuencia correspondiente a los 9 primeros aminoácidos (aas) de la proteína, que expresa PABP1 como un producto de fusión con GST (*glutathione S-transferase*) (Burgui, I. y col., 2003). Fue amablemente cedido por A. Nieto (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid).

- **pMal-c2-2A**. Codifica la secuencia de MBP (*maltose binding protein*) fusionada al gen 2A del PV (Novoa, I., 1996).

Otros plásmidos.

- **pCMV-Fas Δ I6**. Plásmido de expresión en células de mamífero derivado del plásmido pCMV-Fas (Forch, P. y col., 2000). Contiene los exones 5, 6 y 7 del gen *Fas*, con sus respectivos intrones, bajo el control transcripcional de un promotor de citomegalovirus (Izquierdo, J.M. y col., 2005).

- **pT7Sax**. La transcripción con la polimerasa del bacteriófago T7 de este plásmido da lugar al mRNA mayor tardío de adenovirus (Minx) que se empleó en los ensayos de *splicing in vitro* (Watakabe, A. y col., 1993).

2.2.7. Extracción de RNA y RT-PCR a tiempo real.

El aislamiento del RNA se realizó usando los kits comerciales RNA*spin* mini (*GE Healthcare*) o RNA*easy* (*Quiagen*), según las instrucciones de los fabricantes. La cantidad de RNA total purificado se cuantificó usando un espectrofotómetro nanodrop ND-1000.

Para analizar las cantidades relativas de los RNAs celulares, incluyendo el de luciferasa, se realizó una RT-PCR a tiempo real usando sondas Taqman (*Applied Biosystems*) a partir del RNA total procedente de $2,5 \times 10^5$ células (Castello, A. y col., 2006a). Las sondas Taqman frente a los mRNAs cicloxigenasa (cox)-1, cox-2, interleuquina (IL)-2, IL-6, p53 y c-myc fueron amablemente cedidas por M. Fresno (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, UAM, Madrid). La RT-PCR a tiempo real fue realizada según el protocolo descrito anteriormente (Castello, A. y col., 2006a). El análisis de los datos fue llevado a cabo usando el programa informático SDS-7000 (version 1.1), normalizando los resultados en función de la cantidad del rRNA 18S. Las figuras correspondientes a estos ensayos se muestran con intervalos de confianza del 95%, obtenidos a partir del análisis de dos o tres experimentos independientes.

Para cuantificar los RNAs del SV, se aisló el RNA total procedente de $2,5 \times 10^5$ células y se analizó por RT-PCR a tiempo real usando el kit *Master SYBR Green I*, tal y como se describió anteriormente (Castello, A. y col., 2006b). Para cuantificar el RNA genómico y el RNA total del SV se emplearon los oligonucleótidos nsP2-*forward*/nsP2-*reverse* y C-*forward*/C-*reverse*, respectivamente (Tabla 1). La cantidad de RNA subgenómico de SV fue calculado como la diferencia entre la cantidad total de RNA de SV y la de RNA genómico. El análisis de los datos se hizo usando el programa Roche Molecular *Biochemicals LightCycler* (versión 3.3). Los datos obtenidos empleando este método se representaron gráficamente tomando 3 mediciones independientes de 2 o 3 experimentos. Las barras de error representan la desviación estándar (D.E.) obtenida.

2.2.8. Transcripción *in vitro*.

Las reacciones de transcripción *in vitro* se realizaron empleando la polimerasa T7 recombinante (*Promega*), tampón de transcripción y DTT (*Promega*) siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante (Madan, M.V., 2005). Para introducir el *cap* en los mRNAs, se preparó la mezcla de reacción con rGTP $0,25 \mu\text{M}$ y se suplementó con $0,25 \mu\text{M}$ de un análogo de la estructura *cap*, $\text{m}^7\text{G}(5')\text{ppp}(5')\text{G}$ (*Bio labs*). Por otro lado, para añadir la cola de poli(A) *in vitro* se suplementó la mezcla de transcripción con $0,75 \mu\text{M}$ de rATP y 5 U de poli(A) polimerasa (*Invitrogen*) y se incubó a 37°C 1 hora adicional. Para ensayos de traducción *in vitro* el RNA transcrito se aisló empleando columnas *Chroma Spin DEPC-H₂O* (*Clontech Laboratories, Inc.*), según el protocolo descrito por la casa comercial. Por último la concentración del RNA se determinó usando un espectrofotómetro nanodrop ND-1000 y la integridad del mismo se corroboró mediante su visualización en gel de agarosa.

2.2.9. siRNAs.

En la tabla 2 se pueden observar las secuencias de los RNAs interferentes (siRNAs) (*Gene Link*) empleados en esta tesis doctoral.

Nombre	Diana	Secuencia
si4GI-31	eIF4GI	CCCATACTGGAAGTAGAAG
si4GI-1	eIF4GI	GGAATATCAAGTTTATTGG
si4GI-2	eIF4GI	CAAAGACCTGGACTTTGAA
si4GI-3	eIF4GI	GAGCGAAGCTGCTGCAGAA
si4GII-1	eIF4GII	CAAAGACTTGGTCTTTGTT
si4GII-2	eIF4GII	CACTGAGGCTGAGCGAAAT
si4GII-3	eIF4GII	CAGATGACATGGCCATTGA
sip97-1	P97/NAT/DAP5	AGTCGTTCCCTAATGAATAA
sip97-2	P97/NAT/DAP5	TGATCACGTTGATCTACAA
sip97-3	P97/NAT/DAP5	GTAAGAGGCATACTAAATA
sip97-4	P97/NAT/DAP5	ACGAATCTATCCTTCATAA
si4E	eIF4E	TACATTAATCGGTAGCAGGAA
siControl	Negativo	- (fusionado a fluoresceína)
siLuc	Luciferasa (<i>P. pyralis</i>)	- (fusionado a fluoresceína)

Tabla 2. siRNAs. En la tabla se indica el nombre de cada siRNA, especificando su mRNA diana y su secuencia.

2.2.10. Aislamiento del RNA nuclear y citoplasmático de células de mamífero.

La separación de la población nuclear y citoplásmica de RNAs se realizó siguiendo el protocolo descrito por C. Perales (Perales, C. y col., 2005, Perales, C., 2002). Los RNAs presentes en las distintas fracciones se aislaron del modo descrito en la sección 2.7. y se determinaron sus concentraciones en el espectrofotómetro nanodrop ND-1000.

2.2.11. Ensayo de *splicing in vitro*.

El mRNA mayor tardío de adenovirus (Minx) fue producido tal y como se describió previamente (Forch, P. y col., 2000). Los extractos nucleares de células HeLa fueron amablemente cedidos por J.M. Izquierdo (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, UAM, Madrid). Las reacciones de *splicing in vitro* fueron realizadas en presencia o ausencia de ATP siguiendo el procedimiento descrito por Förch y col. (Forch, P. y col., 2000). Las reacciones se preincubaron con 20 ng de HIV-1 PR o 5 µg de MBP-2A^{pro} durante 15 min. Después, se añadió 40.000 cpm del pre-mRNA de Minx marcado con [P³²] y se incubaron durante 30 min. Las muestras se recogieron en tampón de carga y fueron procesadas tal y como se describió anteriormente (Forch, P. y col., 2000).

2.2.12. Traducción *in vitro*.

El mRNA sintetizado *in vitro* y purificado fue empleado en reacciones de traducción *in vitro* en extractos celulares. La concentración de acetato potásico (AcKO) y MgCl₂ presente en las mezclas de reacción se optimizó para cada mRNA tal y como se indica en la tabla 2. Las reacciones se realizaron usando las cantidades de mRNA indicadas en los respectivos pies de figura a una temperatura de 30° C durante entre 1 y 3 horas. El marcaje radiactivo de la síntesis de proteínas en extractos celulares se realizó preparando las mezclas de reacción en ausencia de metionina y cisteína y suplementándolas a las horas indicadas con 25 µCi de la mezcla *translabel* (Amersham), constituida por dichos aas marcados con el isótopo [S³⁵] ([S³⁵]-metionina y [S³⁵]-cisteína). Tras 1 h de incubación se añadió a cada muestra tampón de carga para proteínas (2% SDS, 11,6% glicerol, DTT 0,1M y azul de bromofenol al 0,033%) para analizar la síntesis de proteínas por SDS-PAGE o bien se utilizó un tampón específico para medir la actividad luciferasa. Los extractos empleados fueron:

- **Reticulocitos de Conejo tratados con nucleasa** (RRL, *rabbit reticulocyte lysates*): las reacciones de traducción empleando estos extractos se realizaron siguiendo las instrucciones del proveedor (*Promega*).

- **Extractos de células HeLa**: las fracciones S₁₀ tratadas con nucleasa, proceden de la lisis de células HeLa y fueron cedidas por E. Wimmer (State University of New York at Stony Brook Stony Brook). Tanto los extractos como las mezclas de reacción fueron realizados tal y como se describió previamente (Cuconati, A. y col., 1998, Molla, A. y col., 1991).

- **Extractos Krebs-2**: Los lisados se obtuvieron a partir de fracciones S₁₀ de células Krebs-2 de tumor ascítico, y fueron cedidos amablemente por J.J. Berlanga (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, UAM, Madrid). Las mezclas de reacción se realizaron tal y como se describió previamente (Khaleghpour, K. y col., 2001b, Svitkin, Y.V. y Sonenberg, N., 2004).

mRNA	AcKO	MgCl ₂
(+/-)	50 mM	2 mM
(E/-)	150 mM	2,8 mM
(P/-)	100-150 mM	2,8 mM
(CrV/-)	150-200 mM	3-3,5 mM

Tabla 3. Optimización de las concentraciones de sales para la traducción en extractos celulares de distintos mRNAs. En la tabla se muestran las concentraciones óptimas de acetato potásico (AcKO) y MgCl₂ para la traducción de mRNAs de luciferasa que contienen la secuencia líder de luciferasa (+/-), la del EMCV, del PV o del virus de la parálisis del grillo (CrV) y no poseen cola de poli(A) en extractos de células HeLa y Krebs-2.

2.3. MANIPULACIÓN DE CÉLULAS DE MAMÍFERO Y VIRUS

2.3.1. Líneas celulares de mamífero.

Las líneas celulares empleadas en este trabajo fueron las siguientes:

- **HeLa** (ATCC CCL 2): células epiteliales procedentes de un carcinoma de cuello de útero humano. Se emplearon para amplificar el vvT7. Además, esta línea celular se utilizó para expresar 2A^{pro} y determinar sus efectos en expresión génica. Por último, fue el modelo celular elegido para la transfección de siRNAs.

- **HeLa X1/5**: línea celular derivada de la anterior que produce el mRNA de luciferasa (*Photinus pyralis*), de forma reprimible por tetraciclina (Gossen, M. y Bujard, H., 1992, Novoa, I. y Carrasco, L., 1999).

- **Huh-7**: células de hepatocarcinoma humano. Fueron amablemente cedidas por R. Bartenschlager (Johhanes-Gutenberg University, Mainz).

- **Vero** (ATCC CCL 81): células de riñón de mono verde africano. Utilizadas para la titulación del vvT7.

- **COS-7** (ATCC CRL 1650): células de mono verde africano transformadas con el antígeno T del virus SV40. Utilizada para la expresión transitoria de proteasas virales.

- **MT-2** (ECACC 93121518): linfocitos humanos transformados por HTLV-1. Utilizados para infectar con HIV-1.

- **BHK-21** (ATCC CCL 10): células de riñón de hámster neonato. Esta línea celular fue empleada en las infecciones y transfecciones con el SV y sus variantes. Además, fueron utilizadas para la expresión transitoria de la proteasa 2A del PV.

2.3.2. Virus.

Los virus empleados en este trabajo fueron los siguientes:

- **Virus de la vacuna T7-recombinante** (vvT7) : cedido amablemente por B. Moss (NIH, Bethesda). Este virus se amplificó mediante pases consecutivos (no más de dos) en células HeLa y se tituló por el método de plaqueo en agar en células Vero. Estas técnicas fueron descritas con detalle anteriormente (Castrillo, J.L., 1986).

- **Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1** (HIV-1): se empleó la cepa NL4.3. (Ventoso, I. y col., 2001).

- **Virus sindbis** (SV): este virus fue obtenido a partir del plásmido pT7SVwt, derivado a su vez del pTE3,2J1, que porta el clon infeccioso (Hahn, C.S. y col., 1992). A partir de este plásmido se obtuvieron distintos SV recombinantes que expresaban diferentes proteasas virales (SV-PR y SV-2A) o genes reporteros (SV-Luc y SV-GFP). El SVwt, además del resto de SV recombinantes, se amplificaron en células BHK. En el caso del SV-PR, se añadió al medio de

cultivo saquinavir (SQ) 12 μ M. Posteriormente, los virus se titularon en las mismas células mediante el método de análisis de placas de lisis en agar.

2.3.3. Mantenimiento y cultivo de líneas celulares.

Las diferentes líneas celulares se cultivaron en medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (*Difco*) (Dulbecco, R. y Freeman, G., 1959), suplementado con 50 U/ml de penicilina, 50 U/ml de estreptomycin, 0,2 μ g/ml del éster butírico del ácido p-hidroxibenzoico (*Sigma*) y glutamina a una concentración de 4 mM (*Merck*). Los medios se suplementaron con suero fetal de ternera (Flow) al 5% (v/v) y se mantuvieron en incubadores a 37° C, con una humedad relativa del 95% y una presión parcial de CO₂ del 7%.

Las células se conservaron en nitrógeno líquido en el mismo medio con alta concentración de suero fetal bovino (20%) y del agente crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO) 7%.

En los plaqueros las monocapas celulares se cubrieron con medio DMEM suplementado con agar al 0,7% y suero fetal al 2% (Castrillo, J.L., 1986).

2.3.4. Expresión transitoria en células de mamífero.

- **Electroporación:** este sistema se empleó como método de transfección de RNA desnudo en células de mamífero. Para electroporar células BHK se siguió el protocolo descrito por M.A. Sanz (Sanz, M.A., 1998, Sanz, M.A. y Carrasco, L., 2001). En cambio, la electroporación de células HeLa se realizó siguiendo el protocolo descrito para esta línea celular (Castello, A. y col., 2006a).

- **Sistema vvT7:** este método se empleó para la expresión transitoria de proteasas virales a partir de plásmidos que contienen el promotor de la polimerasa del bacteriófago T7. Para ello se empleó como transfectante la lipofectamina (*Invitrogen*) tal y como describió en detalle E. Álvarez en su tesis doctoral (Alvarez, E. y col., 2003, Álvarez, E., 2004).

- **Transfección de siRNAs:** para la transfección de siRNAs se emplearon monocapas de células HeLa o Huh-7 a una confluencia de 70-80% en placas de 24 pocillos. Las mezclas de transfección se prepararon añadiendo 0,5 μ g/pocillo de lipofectamina 2000 (*Invitrogen*) en 50 μ l/pocillo Opti-MEM I *Reduced serum medium* (*Invitrogen*), tal y como describe el proveedor. En paralelo, se añadieron 25 pmoles de cada siRNA en 50 μ l de Opti-MEM I y, tras 15 min de incubación a temperatura ambiente, se mezcló la suspensión de lipofectamina 2000 con el siRNA. La mezcla resultante se añadió a las monocapas de células y se mantuvo durante 4 horas. Finalmente, el medio de transfección se retiró y se añadió medio DMEM, con suero fetal bovino al 5% y sin antibióticos ni antimicóticos. En general, los protocolos de transfección de siRNAs consistieron en dos transfecciones: una en el momento de inicio del experimento y otra 24 h después.

2.3.5. Ensayo de *splicing* en células en cultivo.

Se electroporaron células HeLa con las cantidades indicadas del EMC-2A. 4 h después, se transfectaron con 1 µg del plásmido pCMV-Fas ΔI6, que codifica secuencias genómicas de Fas. A las 16 hpe se recogieron las células en el tampón de fraccionamiento y el RNA se aisló de las fracciones totales, nucleares y citoplásmicas. El RNA aislado fue procesado tal y como se describe por Izquierdo y col. (Izquierdo, J.M. y col., 2005).

2.3.6. Marcaje metabólico de proteínas y obtención de extractos.

El marcaje radiactivo de proteínas en cultivos celulares se realizó durante una hora en DMEM sin metionina ni cisteína al que se añadió 25 µCi de la mezcla *translabel* (Amersham) descrita en detalle en la sección 2.13. Las células se recogieron en tampón de carga para proteínas (Tris-HCl 0,37 M (pH 6,8), DTT 0,1 M, SDS al 1%, glicerol al 17% y azul de bromofenol al 0,024%) y se hirvieron durante 5 minutos.

2.3.7. Microscopía óptica.

Para estudiar el efecto citopático de las proteínas virales expresadas en células de mamífero, las células se cultivaron sobre cubreobjetos. A las horas indicadas se lavaron con tampón salino fosfato (PBS) y se fijaron durante 20 minutos con paraformaldehído (PFA) al 4% (p/v) preparado en PBS (Madan, M.V., 2005). Finalmente las células se montaron en portaobjetos, usando *Mowiol DABCO* (Calbiochem), invirtiendo los cubreobjetos. Las células se observaron empleando el microscopio *Axiovert 200 inverted microscope* (Zeiss) con un objetivo 20 x 0,6 *Plan-Apochromat Ph2*.

2.3.8. Microscopía confocal.

Las células a estudio se cultivaron sobre cubreobjetos esterilizados a la llama, colocados previamente en las placas de 24 pocillos. A las horas determinadas se procesaron tal y como describe en detalle M.V. Madan en su tesis doctoral (Madan, M.V., 2005). Los anticuerpos primarios y secundarios empleados se muestran en la sección 4.4. Las células se visualizaron en el microscopio confocal *Radiance 2000* (Bio-Rad/Zeiss) utilizando el objetivo 63x/1.4 *oil Plan-Apochromat* (Zeiss).

- **Inmunofluorescencia doble:** para detectar simultáneamente dos proteínas en la célula, se procedió tal y como se describió previamente (Madan, M.V., 2005).

- **Tinción nuclear:** las células fijadas, permeabilizadas e incubadas con los correspondientes anticuerpos se trataron durante 10 minutos con una dilución 1:500 del compuesto To-Pro 3 (*Invitrogen*), mezclado en PBS. Tras 3 lavados con PBS, las muestras se procesaron y se montaron sobre los portaobjetos con *Mowiol* tal y como se describe anteriormente.

2.3.9. Detección de los mRNAs por hibridación *in situ* (FISH).

Para determinar la localización subcelular de los mRNAs se empleó un oligonucleótido de 50 desoxitimas conjugado a fluoresceína (OligodT-F, *Gene Link*). El OligodT-F hibrida específicamente con las colas de poli(A) de los mRNAs, permitiendo determinar su localización en la célula. Así, las células transfectadas se sembraron sobre cubreobjetos (en placas de 24 pocillos), se lavaron con PBS, se fijaron con PFA al 4% y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,2%. Posteriormente, se realizaron 3 lavados seriados: el primero con PBS, el segundo con una mezcla 1:1 de PBS y SSC 2X, y un tercero con SSC 2X. Después, las células se incubaron con la solución de pre-hibridación (SSC 2X, Formamida al 20%, BSA al 0,2 % y 1mg/ml de tRNA de levadura) durante 15 minutos. Posteriormente, se añadió la solución de hibridación, de composición similar a la del buffer de pre-hibridación a la que se suplementó con Dextran Sulfato al 10% y el OligodT-F (1 pmol/ μ l), y se mantuvo durante 4 horas a 37°C en un incubador de células. Posteriormente, se realizaron 3 lavados seriados de 5 minutos a 42°C: el primero se hizo con SSC 2X con formamida al 20%; el segundo con SSC 2X; y el tercero con una mezcla 1:1 de SSC 2X y PBS. A partir de este paso se continuó con el protocolo de inmunofluorescencia y/o tinción nuclear descritos anteriormente.

2.4. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS.

2.4.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

El análisis electroforético de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se describe en la tesis de J.L. Castrillo y P.L. Rodríguez (Castrillo, J.L., 1986, Rodríguez, P.L., 1994). El porcentaje de acrilamida varió en función de las proteínas a estudio: 15% para analizar la traducción por autorradiografía y para detectar proteínas de peso molecular intermedio; 7,5-10% para detectar proteínas de alto peso molecular y 17% para hacer lo propio con proteínas de bajo peso molecular (Álvarez, E., 2004).

2.4.2. Tinción con azul de Coomassie y fluorografía-autorradiografía.

La tinción de proteínas se llevó a cabo con el colorante azul de Coomassie al 0,1% (p/v) siguiendo el protocolo descrito previamente (Sambrook, J. y col., 2001).

El proceso para la fluorografía-autorradiografía de los geles fue descrito en detalle por E. Álvarez y M.A. Sanz (Álvarez, E., 2004, Sanz, M.A., 1998). El análisis cuantitativo de la síntesis de proteínas fue realizado escaneando las películas fotográficas y realizando una densitometría.

2.4.3. Inmunodetección de proteínas por *western blot*.

Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (*Bio-Rad*) tal y como se describió previamente (Harlow, E. y Lane, D., 1988). El *western blot* fue realizado siguiendo el protocolo detallado por E. Álvarez en su tesis doctoral (Álvarez, E., 2004). El revelado de las nitrocelulosas se hizo usando el kit comercial ECL, según las instrucciones del fabricante (*Amersham Biosciences*). El análisis de la cantidad de cada proteína en los distintos experimentos se realizó mediante la densitometría de la película fotográfica. La representación los datos en gráficas se realizó con resultados obtenidos de, al menos, dos experimentos y las barras de error representan la D.E.

La reutilización de la membrana de nitrocelulosa para el uso de otro anticuerpo (*stripping*) se realizó tal y como se describió previamente (Madan, M.V., 2005).

2.4.4. Sueros y anticuerpos.

Los anticuerpos empleados en este trabajo fueron los siguientes:

- **Anti-eIF4GI**: anticuerpos policlonales frente al factor de iniciación de la traducción 4GI. Fueron obtenidos tras la inmunización de conejos con péptidos sintéticos derivados de la región N-t o C-t del eIF4GI humano (Aldabe, R. y col., 1995b, Novoa, I., 1996). Generalmente se empleó una mezcla de los dos anticuerpos (1:2000). En inmunofluorescencia se emplearon por separado en una dilución 1:1000.

- **Anti-fosfoeIF4GI (Ser 1108)**: anticuerpo policlonal de conejo que reconoce eIF4GI únicamente cuando se encuentra fosforilado en posición 1108. Este anticuerpo fue proporcionado por *cell signaling* y fue empleado en *western blotting* a una dilución 1:1000.

- **Anti-eIF4GII**: anticuerpos policlonales obtenidos frente a la región N-t y C-t del factor de iniciación de la traducción 4GII. Fueron amablemente cedidos por N. Sonenberg (Mc Hill University, Montreal) (Gradi, A. y col., 1998a, Gradi, A. y col., 1998b). Se emplearon a una dilución 1:1000 para *western blot* y 1:500 para inmunofluorescencia.

- **Anti-eIF4A**: sobrenadante de hibridoma de anticuerpo monoclonal frente a eIF4A. Cedido amablemente por H. Trachsel (Institute for Biochemistry and Molecular Biology, University of Berne). Se empleó en *western blot* a una dilución 1:50.

- **Anti-eIF4E**: anticuerpo monoclonal frente al factor de iniciación de la traducción 4E. Proporcionado por *Santa Cruz Biotechnology*. Se empleó en *western blot* a una dilución 1:250 y en inmunofluorescencia a 1:50.

- **Anti-eIF3**: anticuerpo policlonal de cabra frente al complejo eIF3. Fue cedido amablemente por J.W. Hershey (Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Davis) y usado en *western blot* a una dilución 1:1000.

- **Anti-eIF3, subunidad p100**: anticuerpo policlonal de cabra frente a la proteína p100 del complejo eIF3. Fue proporcionado por *Santa Cruz Biotechnology* y empleado a una dilución 1:250 para *western blot* y 1:50 para inmunofluorescencia.

- **Anti-p97**: Anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra la proteína NAT1/DAP-5/p97, miembro de la familia eIF4G. Este anticuerpo fue amablemente cedido por Thomas Preiss (Victor Chang Cardiac Research Institute, Sydney). Se utilizó a una dilución 1:1000 en *western blot*.

- **Anti-PABP**: anticuerpo monoclonal frente a PABP proporcionado por *Abcam*. Se empleó para *western blot* a una dilución 1:250 y 1:50 para inmunofluorescencia.

- **Anti-CBP80**: anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteína CBP80. Amablemente cedido por E. Izaurralde (Max Planck Institute for Developmental Biology, Tübingen). Se usó a una dilución 1:1000 en *western blot*.

- **Anti-CBP20**: anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteína CBP20. Amablemente cedido por la E. Izaurralde (Max Planck Institute for Developmental Biology, Tübingen). Se usó en una dilución 1:200 en *western blot*.

- **Anti-Ref-1**: anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteína Ref-1 (Aly). Amablemente cedido por E. Izaurralde (Max Planck Institute for Developmental Biology, Tübingen). Se empleó a una dilución 1:1000 en *western blot*.

- **Anti-U2AF65**: anticuerpo monoclonal MC3 que reconoce específicamente U2AF65. Amablemente cedido por J.M. Izquierdo (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, UAM, Madrid). Se utilizó a una dilución 1:1000 en *western blot* y 1:500 en inmunofluorescencia.

- **Anti-U2AF35**: anticuerpo policlonal de conejo obtenido frente a U2AF35. Amablemente cedido por J.M. Izquierdo (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, UAM, Madrid). Se usó a una dilución 1:500 en *western blot*.

- **Anti-PTB**: anticuerpo monoclonal producido frente al extremo C-t de PTB-1 (*Sigma*). Usado en dilución 1:1000 para *western blot*.

- **Anti-SFPQ**: anticuerpo monoclonal frente a SFPQ (*Abcam*). Amablemente cedido por J. Ortín (Centro Nacional de Biotecnología). Empleado en dilución 1:1000.

- **Anti-Gemina-3**: anticuerpo monoclonal frente al extremo C-t de la proteína del complejo SMN, gemina-3 (*Abcam*). Fue empleado en dilución 1:400 para *western blot*.

- **Anti-SPF45**: anticuerpo policlonal de cabra frente a la proteína recombinante SFP45 (*Dundee Cell Products*). Empleado en dilución 1:500 para *western blot*.

- **Anti-Hsp70**: anticuerpo policlonal de cabra producido frente a la proteína Hsp70. Proporcionado por *Santa Cruz Biotechnology* y empleado en *western blot* a una dilución 1:200.

- **Anti- α -Tubulina**: anticuerpo monoclonal realizado frente a α -Tubulina. Suministrado por *Sigma*. Se empleó en una dilución 1:5000 para *western blot* y 1:1000 para inmunofluorescencia.

- **Anti- β -Actina:** anticuerpo monoclonal frente a β -actina (*Sigma*). Empleado en *western blot* a una dilución 1:1000.

- **Anti-p55/p24 HIV-1:** anticuerpo monoclonal frente a la proteína p24 (proteína de la cápsida) de HIV-1. Cedido amablemente por R.B. Forns y R.S. Tender del EU *programe EVA/MRC Centralised Facility for AIDS Reagents*, NIBSC UK. Se usó a una dilución 1:500 en *western blot*.

- **Anti-HIV-1 PR:** Anticuerpo policlonal de cabra realizado frente a la proteasa de HIV-1. Fue cedido por EU *programe EVA/MRC Centralised Facility for AIDS Reagents*, NIBSC UK y utilizado para *western blot* a una dilución 1:700.

- **Anti-C del SV:** anticuerpo policlonal de conejo obtenido frente a la proteína C del SV. Fue obtenido en nuestro laboratorio por M.A. Sanz (Sanz, M.A. y col., 2007). Se empleó en dilución 1:1000 en *western blot*.

- **Anti-Luciferasa:** anticuerpo policlonal de conejo obtenido frente a la luciferasa de *Photinus pyralis*. Suministrado por *Promega*. Se usó a una dilución 1:1000 para *western blot*.

- **Anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa:** estos anticuerpos fueron empleados como anticuerpos secundarios en *western blot*. El anti-IgG de conejo (*Pierce*) fue empleado a una dilución 1:10.000; el anti-IgG de ratón (*Promega*) a 1:5000 y el anti-IgG de cabra (*Santa Cruz Biotechnology*) a 1:5000.

- **Anti-rabbit Alexa 488 (*Invitrogen*):** anticuerpo policlonal realizado frente a anticuerpo de conejo conjugado al fluoroforo *Alexa 488* (Verde). Se empleó como anticuerpo secundario a una dilución 1:500.

- **Anti-rabbit Alexa 555 (*Invitrogen*):** anticuerpo policlonal conjugado al fluoroforo *Alexa 555* (rojo). Se empleó como anticuerpo secundario a una dilución 1:500.

- **Anti-mouse Alexa 488 (*Invitrogen*):** anticuerpo conjugado al fluoroforo *Alexa 488* (Verde). Reconoce anticuerpos primarios de ratón. Se empleó como anticuerpo secundario a una dilución 1:500.

- **Anti-mouse Alexa 555 (*Invitrogen*):** anticuerpo conjugado al fluoroforo *Alexa 555* (rojo). Se empleó como anticuerpo secundario a una dilución 1:500.

- **Anti-goat Alexa 594 (*Invitrogen*):** anticuerpo conjugado al fluoroforo *Alexa 594* (rojo). Reconoce anticuerpos primarios producidos en cabra. Se empleó como anticuerpo secundario a una dilución 1:500.

2.4.5. Valoración de la concentración de proteínas.

Para determinar de la concentración de proteínas en una muestra se empleó un *kit* comercial (*Bio-Rad*) basado en el método de *Bradford* de cuantificación de proteínas.

2.4.6. Aislamiento de proteínas del núcleo y citoplasma de células de mamífero.

Para aislar las poblaciones de proteínas presentes en el núcleo o en el citoplasma de las células se siguió el protocolo descrito anteriormente (Perales, C. y col., 2005, Perales, C.B., 2002), con la salvedad de que se emplearon inhibidores de proteasas (PMSF 1mM, Leupeptina 1µg/ml, Iodoacetamida 1 mM y Aprotinina 1µg/ml) en lugar o además del inhibidor específico de RNAsas, RNAsin (*Invitrogen*).

2.4.7. Purificación de proteínas.

La proteasa MBP-2A, compuesta por la proteasa 2A del PV fusionada a la proteína de unión a maltosa (*maltose binding protein*, MBP) se purificó tal y como se describió previamente (Novoa, I., 1996, Novoa, I. y col., 1997). La proteasa de HIV-1 fue facilitada por I. Pitchova del *EU progame EVA/MRC Centralised Facility for AIDS Reagent, NIBSC, UK*. La proteasa de HIV-2 fue proporcionada por B. Shirley y M. Cappola (*Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals*) del *Nacional Institutes of Health (NIH), AIDS Reseach and Referente Reagent Program*. La proteasa de MoMLV fue amablemente cedida por L. Menéndez-Árias y se purificó según se describió previamente (Menendez-Arias, L. y col., 1993). La proteasa 3C-His fue amablemente cedida por C.E. Cameron (Pennsylvania State University, Pennsylvania, USA) (Franco, D. y col., 2005a;b). Para obtener GST-PABP se empleó el plásmido pGEX-2T-PABP1 y la cepa de *E. coli* BL-21 según se describió previamente (Burgui, I. y col., 2003). Se aisló mediante cromatografía de afinidad según se describió previamente (De Gregorio, E. y col., 1998).

2.4.8. Ensayos proteolíticos.

Para estudiar el corte de factores de iniciación de la traducción en sistemas libres de células se emplearon extractos de HeLa, Krebs-2 o RRL y se añadieron a las mezclas de reacción 2 ng/µl de HIV-1 PR, 2 ng/µl de 3C^{pro}-His o 5 µg de MBP-2A^{pro}. A los tiempos indicados se detuvo la reacción añadiendo tampón de carga de proteínas 2X o tampón para la medida de actividad lucifereasa.

Para determinar cortes proteolíticos directos y definir los sitios de hidrólisis, se empleó la secuenciación de péptidos mediante la degradación de Edman, tal y como describió en detalle E. Álvarez (Álvarez, E. y col., 2003, Álvarez, E., 2004).

2.4.9. Medida de la actividad luciferasa.

La actividad luciferasa (de *Photinus pyralis*) se midió usando el kit comercial *Luciferase Assay System (Promega)* y 5-20 µl de la muestra en un luminómetro *Monolight 2010 (Molecular Dynamic)*. La representación de las mediciones de actividad luciferasa en gráficas se realizó tomando 3 mediciones independientes de, al menos, dos experimentos. Las barras de error representan la D.E. obtenida.

RESULTADOS



3.1. EFECTO DE LA HIDRÓLISIS DE eIF4GI Y eIF4GII EN LA TRADUCCIÓN DE mRNAs CELULARES Y VIRALES.

Ciertas proteasas virales poseen la capacidad de hidrolizar proteínas celulares que actúan como elementos clave en la regulación de la expresión génica. De este modo, inhiben la síntesis de las proteínas celulares a la vez que potencian la producción de las proteínas virales (Lloyd, R.E., 2006). Las proteasas 2A y 3C del PV hidrolizan diversas proteínas celulares, incluyendo factores de transcripción y de traducción (Lloyd, R.E., 2006, Weidman, M.K. y col., 2003). Durante las últimas dos décadas se ha intentado determinar el papel del corte proteolítico de los factores eIF4GI, eIF4GII y PABP inducidos por estas dos proteasas en el ciclo infectivo del PV (Gradi, A. y col., 1998b, Krausslich, H.G. y col., 1987, Kuyumcu-Martinez, N.M. y col., 2004). Sin embargo, aún se intenta definir el grado de contribución a la inhibición de la síntesis de proteínas celulares de la proteólisis de cada factor.

3.1.1. Transfección de células HeLa con mRNAs que codifican para la proteasa 2A del PV: efecto en la síntesis de proteínas celulares.

Con el fin de determinar el papel del corte de eIF4GI, eIF4GII y PABP en la infección del PV, transfectamos células HeLa con los plásmidos pTM1-2A o pTM1 vacío, de forma acoplada a la infección con el virus vvT7, en presencia del inhibidor de la replicación del virus vaccinia AraC. El virus vvT7 produce la RNA polimerasa del bacteriófago T7, necesaria para la transcripción de los plásmidos pTM1, a partir de los genes tempranos del virus, cuya transcripción no se inhibe por el AraC. Así, el plásmido pTM1-2A se transcribe por esta polimerasa en las células transfectadas dando lugar a un mRNA que contiene el IRES del EMCV seguido por la secuencia de 2A^{pro}. A este mRNA se le denomina EMC-2A en los próximos experimentos. La expresión de la proteasa viral con este sistema indujo una potente inhibición de la síntesis de proteínas, coincidiendo con la hidrólisis de eIF4GI, eIF4GII y PABP

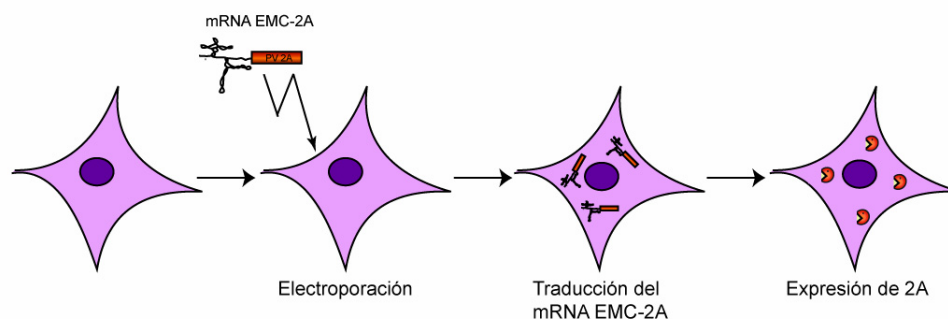


Figura 11. Transfección de EMC-2A. El plásmido pTM1-2A es digerido con el enzima de restricción *Sal I* para linealizar el molde. Posteriormente es transcrito *in vitro* empleando la polimerasa de bacteriófago T7, dando lugar al mRNA EMC-2A (EMC-2A). Este mRNA es introducido en las células mediante electroporación. Su traducción por la maquinaria de síntesis de proteínas celular da lugar a la proteasa 2A de PV.

(Álvarez, E., 2004). Este resultado, sin embargo, no permite saber cómo contribuye cada evento proteolítico a la inhibición de la síntesis de proteínas. El problema de este sistema reside en que no se puede controlar la cantidad de EMC-2A producida a partir del plásmido. Por ello, se buscó un nuevo sistema, que consistió en introducir en las células cantidades definidas de EMC-2A, sintetizado *in vitro* usando como molde el plásmido pTM1-2A (Figura 11). Así, se electroporaron células HeLa con 9 µg de EMC-2A y se analizó la síntesis de proteínas y la integridad de los factores de iniciación a las 8 hpe. Como controles, se electroporaron en paralelo tampón de transcripción, 9 µg de un mRNA producido a partir del plásmido pTM1-2C (EMC-2C), que codifica la proteína 2C del PV o 9 µg de dos versiones del mRNA EMC-2A que codifican para mutantes inactivos de 2A^{pro} (EMC-2AM2 y EMC-2AM15). Estos últimos mRNAs se transcriben a partir de los plásmidos pTM1-2AM2 y pTM1-2AM15 y dan lugar a proteasas 2A con los cambios de aas G60R y G121E, respectivamente, (Ventoso, I. y col., 1998). El mRNA EMC-2A indujo una inhibición total de la síntesis de proteínas, asociado con la hidrólisis casi total de eIF4GI y eIF4GII en las células transfectadas (Figura 12). El patrón de corte de los factores se correspondió con el observado en células infectadas con el PV o en células transfectadas con el plásmido pTM1-2A (datos no mostrados). Por el contrario, PABP no fue hidrolizada (Figura 12B). Aunque la inhibición de la traducción fue casi total, no se pudo detectar la 2A^{pro} ni por inmunodetección ni por autorradiografía (datos no mostrados), lo que sugiere que la 2A^{pro} se produce en cantidades muy bajas. Los mRNAs controles que expresan 2C o una 2A^{pro} inactiva no indujeron la inhibición de la traducción, ni tampoco el corte de los eIFs. Por tanto, estos resultados indican que el corte de PABP no es necesario para inhibir la síntesis de proteínas celulares, mientras que los cortes de eIF4GI y eIF4GII parecen ser suficientes para inducir este fenómeno. Además, la actividad proteolítica de 2A^{pro} debe ser la responsable de este efecto, puesto que los mutantes inactivos de 2A^{pro} no inhibieron la síntesis de proteínas.

Posteriormente, se determinó si este método de expresión de 2A^{pro} era aplicable para otras proteasas virales como la de HIV-1 o la 3C del PV. Para ello, se electroporaron células HeLa con 9 µg de los mRNAs transcritos *in vitro* a partir de los plásmidos pTM1-HIV-1 PR y pTM1-3C (EMC-PR y EMC-3C). La expresión de estas proteasas con este sistema no dio lugar ni a la inhibición de la síntesis de proteínas ni al corte de eIF4G o PABP (datos no mostrados). Este resultado indica que este método, aunque válido para la expresión de 2A^{pro}, no es extrapolable a otras proteasas virales. Posiblemente, se requiere que la proteasa expresada posea una gran estabilidad y actividad.

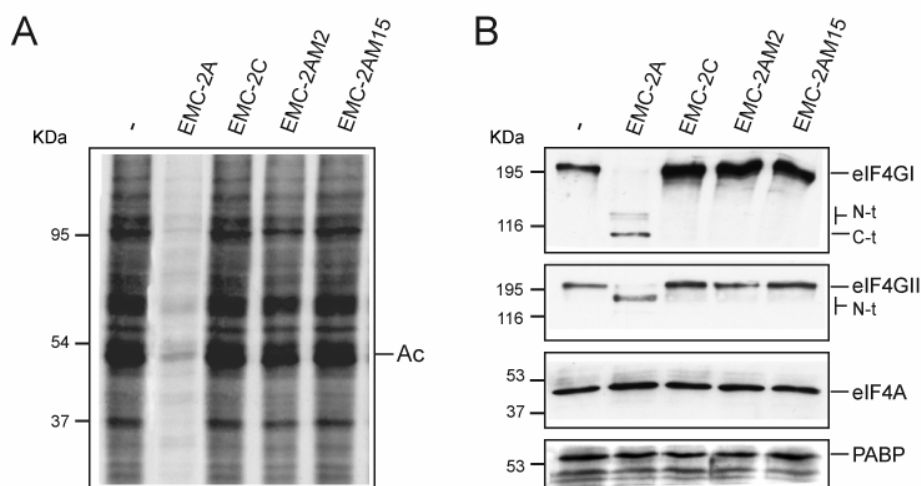


Figura 12. Inhibición de la síntesis de proteínas inducida por el mRNA EMC-2A en Células HeLa. Se electroporaron células HeLa con tampón de transcripción (-) o con 9 μ g de EMC-2A, EMC-2C, EMC-2AM2 o EMC-2AM15. A las 7 hpe las células fueron sometidas a un marcaje radiactivo de proteínas durante 1 h. A las 8h se recogieron en *tampón* de lisis y las muestras fueron analizadas por A) fluorografía y autorradiografía o B) *western blots* con anticuerpos frente a eIF4GI, eIF4GII, eIF4A o PABP. Ac, actina; N-t, producto de proteólisis N-terminal de eIF4G; C-t, producto de corte C-terminal de eIF4G; KDa, marcadores de peso molecular.

3.1.2. Corte diferencial de eIF4GI y eIF4GII en células HeLa X1/5: efecto en la traducción de mRNAs preexistentes o sintetizados *de novo*.

Los resultados del apartado anterior sugieren que el corte de eIF4GI y eIF4GII es suficiente para inhibir la síntesis de actina. La población de mRNAs de actina es principalmente pre-existente; es decir, los mRNAs sintetizados *de novo* son minoritarios comparados con los presentes en el citoplasma. De hecho, cuando un cultivo de células se incubaba con actinomicina D (ActD), un potente inhibidor de la transcripción, la síntesis de actina no se inhibe hasta pasadas 8 h (datos no mostrados). Por ello, nos pareció de interés comparar al mRNA de actina con otro sintetizado *de novo* en cuanto a su capacidad de reclutar la maquinaria de traducción en las condiciones de corte de eIFs provocada por 2A^{pro}. Así, mientras los mRNAs de actina se encuentran predominantemente asociados a los ribosomas, los mRNAs producidos *de novo* deben ser transportados del núcleo al citoplasma y tienen que reclutar los eIFs para iniciar su traducción. Para este fin se empleó la línea celular *tet-off* HeLa X1/5. Estas células poseen integrado en su genoma el gen de la luciferasa (Luc) bajo el control transcripcional de un promotor reprimible por tetraciclina (Tet) (Gossen, M. y Bujard, H., 1992, Novoa, I., 1996). Cuando la Tet está presente en el medio no se produce la síntesis del mRNA de Luc. Sin embargo, cuando se retira el antibiótico se produce una paulatina activación de la transcripción del gen *luc* (Figura 13).

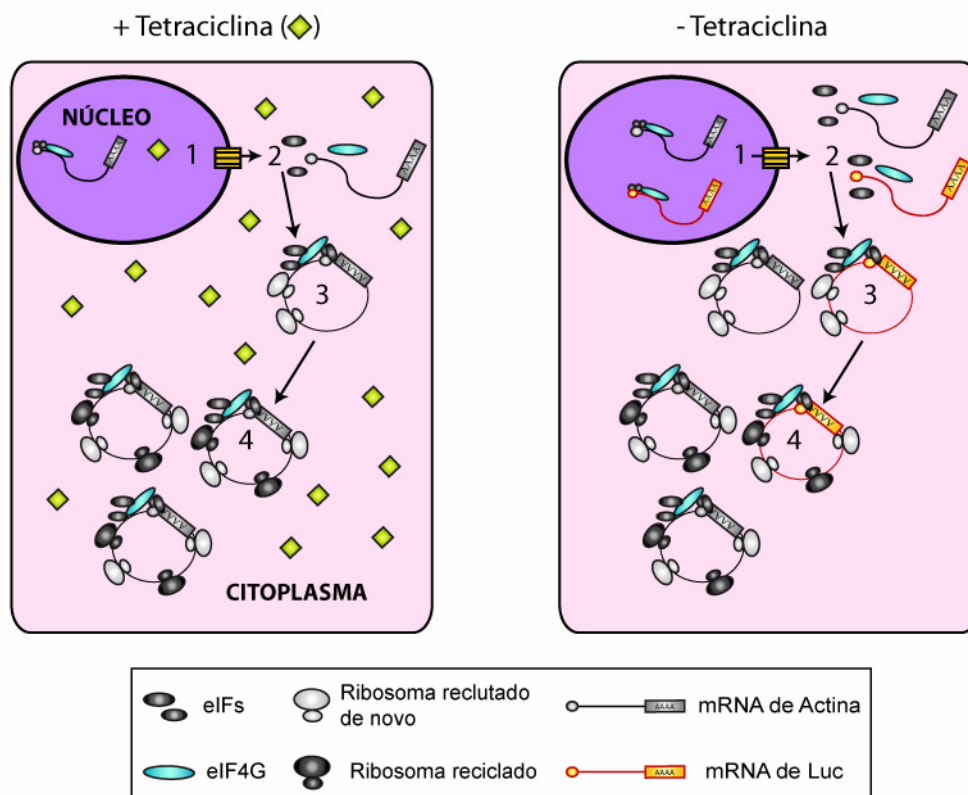


Figura13. Funcionamiento de la línea celular *tet off* HeLa X1/5. Esta línea celular contiene el gen de la luciferasa (Luc) de luciérnaga (*Photinus pyralis*) bajo el control de un promotor reprimible por Tet. En presencia de Tet no se produce la transcripción del gen exógeno, siendo esta inducida cuando el antibiótico es eliminado del medio. (1) Transcripción y formación del complejo nuclear de iniciación de la traducción (*pioneer initiation complex*); (2) reclutamiento de los eIFs; (3) Iniciación de la traducción (*steady state complex*); (4) Reiniciación de la traducción. Tet, tetraciclina.

El corte de eIF4GI y eIF4GII en las células infectadas con el PV responde a cinéticas diferentes. En este sentido, eIF4GI es hidrolizado con mayor rapidez que eIF4GII, aunque es el corte de la forma II el que correlaciona con la inhibición de la síntesis de proteínas celulares (Gradi, A. y col., 1998b). Nuestro siguiente objetivo fue intentar establecer condiciones en las que sólo estuviese proteolizado eIF4GI o en las que tanto eIF4GI como eIF4GII estuviesen cortadas, y determinar sus efectos sobre la síntesis de actina y Luc. Para este fin, electroparamos células HeLa X1/5 con dosis crecientes de EMC-2A y, como controles, 9 μg de EMC-2C o tampón de transcripción. Durante el proceso de electroporación se retiró la Tet del medio, induciendo así la síntesis del mRNA de Luc. A las 4, 6 y 8 hpe se analizó la síntesis de proteínas, el estado de los eIFs y la actividad Luc presente en los extractos. Como se observa en la figura 14A y 15B, la síntesis de proteínas se inhibió en las células transfectadas con el EMC-2A de forma dependiente de dosis y de tiempo. La transfección de 9 μg de este mRNA bloqueó casi completamente la síntesis de actina a partir de las 4 horas post electroporación (4 hpe), mientras que cuando se usó 1 μg sólo se produjeron disminuciones parciales en la incorporación de $[\text{S}^{35}]$ -Met/Cys (Figura 14A, líneas 5, 11 y 17 frente a 2, 8 y 14). La hidrólisis de eIF4GI y

eIF4GII también se produjo de forma dependiente de dosis y tiempo (Figura 14B y 15B). Así, la electroporación de 1 μg de EMC-2A dio lugar a la proteólisis total de eIF4GI, pero no de eIF4GII (Figura 14B, líneas 8 y 14). Ahora bien, conforme se incrementó la dosis de EMC-2A y el tiempo post-electroporación se produjo también la hidrólisis de eIF4GII, siendo prácticamente total con 9 μg a las 6 hpe (Figura 14B y 15B). Ninguna de las dosis empleadas de este mRNA indujo el corte de PABP (Figura 14C). Tal y como se describió con la infección con el PV, el grado de inhibición de la síntesis de actina correlacionó con la cantidad de eIF4GII proteolizado (Figura 14A y B y 15B). Con estos resultados podemos concluir que el corte de eIF4GI inhibe tan sólo parcialmente la síntesis de proteínas. Sin embargo, cuando a la hidrólisis de eIF4GI se le suma la de eIF4GII la inhibición es prácticamente total.

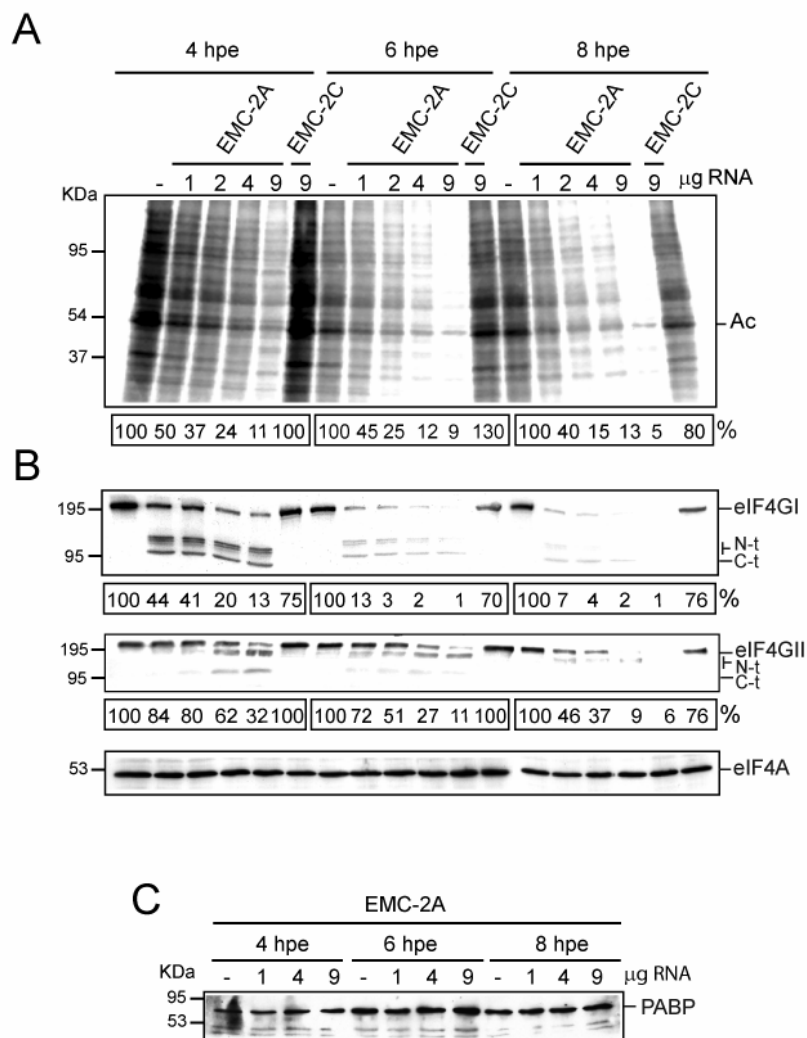


Figura 14. Efecto de 2A^{Pro} sobre la síntesis de proteínas y sobre el estado de eIF4GI, eIF4GII y PABP en células HeLa X1/5. Se electroporaron células HeLa X1/5 con 1, 2, 4 o 9 μg de EMC-2A. Como controles, las células se electroporaron con tampón de transcripción o con 9 μg de EMC-2C. A las 3, 5 y 7 hpe las células fueron sometidas a un marcaje radiactivo de proteínas durante 1 h. A las 4, 6 y 8 hpe la mitad de las células se recogieron en tampón de carga mientras que la otra mitad se recogió con tampón de Luc. A) Análisis de la síntesis de proteínas por fluorografía y autorradiografía. *Western blots* frente a B) eIF4GI (panel superior), eIF4GII (panel central), eIF4A (panel inferior) y C) PABP.

Por otro lado, se analizó la actividad Luc. Así, pudimos observar como los valores de actividad Luc obtenidos en las células control se incrementaron con el paso del tiempo. Sin embargo, en las células transfectadas con el EMC-2A no se incrementó apenas, independientemente de la dosis empleada. Así, mientras que la síntesis de actina sólo se inhibió parcialmente por la transfección de 1 μg de EMC-2A, la síntesis de Luc se bloqueó un 90% en relación con las células control. Por tanto, la traducción del mRNA de Luc, producido *de novo*, fue mucho más sensible a la hidrólisis de eIF4GI que la traducción de un mRNA pre-existente como el de actina, que requirió el corte adicional de eIF4GII para ser inhibida (Figura 15A y B).

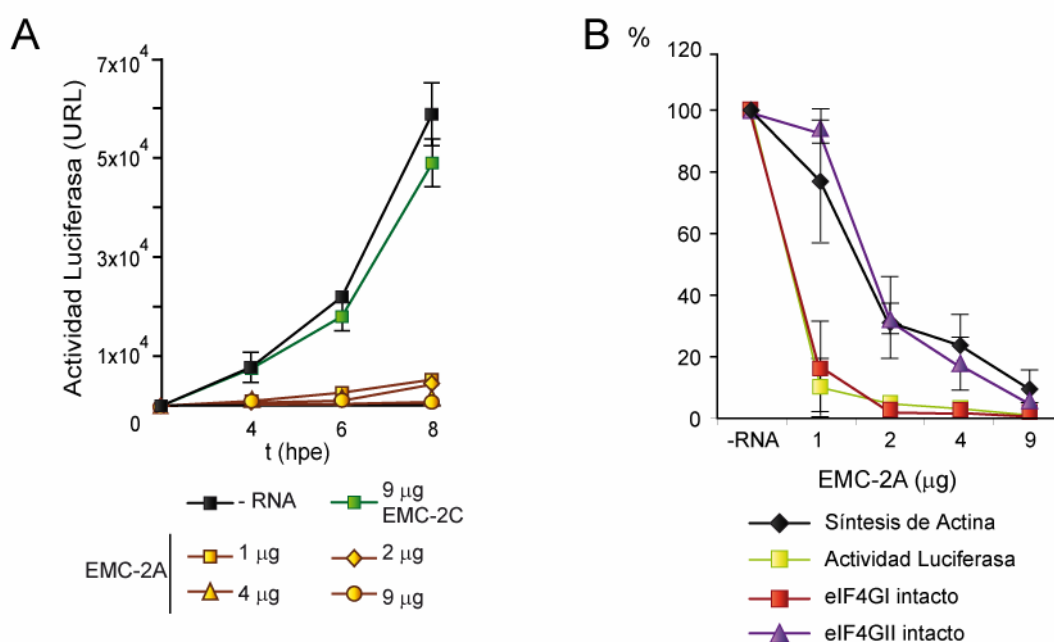


Figura 15. Efecto de 2A^{pro} sobre la síntesis de luciferasa en células HeLa X1/5. Las muestras recogidas en el experimento anterior en tampón Luc se analizaron en el luminómetro. A) Medición de la actividad Luc. B) Representación de las cantidades de eIF4GI y eIF4GII intacto con respecto a la síntesis de Luc y actina en células HeLa a las 8 hpe en relación con la dosis empleada de EMC-2A. Los resultados representados fueron obtenidos de 5 experimentos independientes. RLU, unidades relativas de luz; Luc, luciferasa.

Se ha descrito que la 2A^{pro} del PV es capaz de inhibir la transcripción en las células infectadas (Weidman, M.K. y col., 2003). Para descartar que la proteasa viral pudiese afectar a la cantidad total de los mRNAs estudiados, se cuantificó el mRNA de actina y de Luc presentes en las células electroporadas. Pese a detectar ligeras variaciones en la cantidad total de estos dos mRNAs, dichas fluctuaciones no eran ni significativas, ni correlacionaban con la dosis de EMC-2A empleadas (Figura 16A y B). Por tanto, la inhibición de la síntesis de proteínas no es debida a un daño en la maquinaria de transcripción.

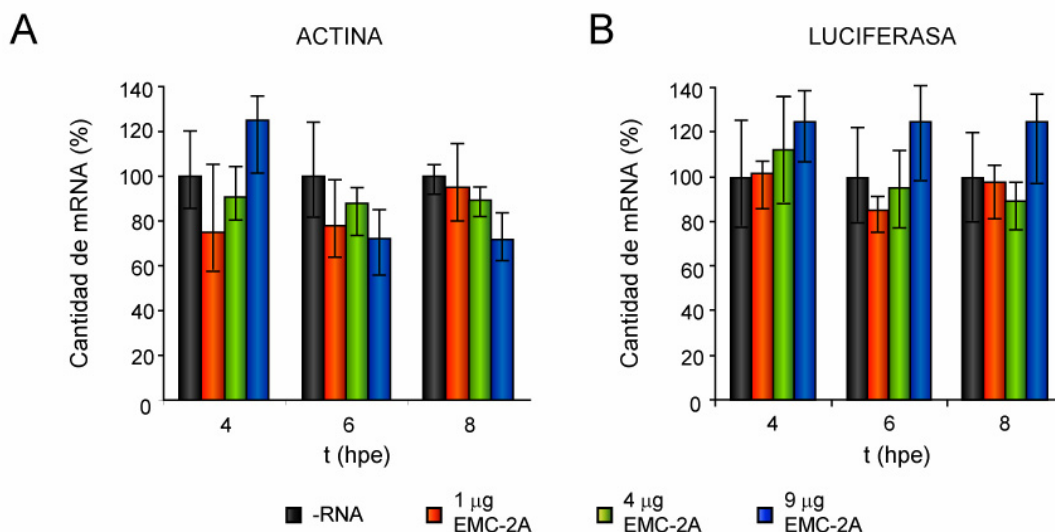


Figura 16. Cuantificación de los mRNAs de actina y luciferasa en las células transfectadas con EMC-2A. En paralelo al experimento anterior se sembraron células electroporadas por triplicado con 1, 4 ó 9 µg de EMC-2A o con tampón de transcripción como control en placas de cultivo p60. A las 8 hpe se recogieron en PBS y se aisló el RNA total. Las muestras fueron analizadas por RT-PCR a tiempo real y normalizadas respecto a la cantidad de rRNA 18S. A) Cantidad relativa del mRNA de actina. B) Cantidad relativa del mRNA de Luc. Las barras de error se corresponden con el intervalo de confianza del 95% de la medición por triplicado de las muestras en 3 experimentos independientes.

3.1.3. Requerimiento diferencial de eIF4GI y II para la traducción de los mRNAs de Luc sintetizados *de novo* o pre-existentes.

Los resultados del experimento anterior indican que los mRNAs recién sintetizados y aquellos que ya están asociados con la maquinaria de traducción pueden tener un requerimiento distinto en eIFs para traducirse. Sin embargo, se comparan mRNAs diferentes (Luc y actina). Por ello, se testó el comportamiento de un mismo mRNA sintetizado *de novo* o asociado con los ribosomas. Así, eliminamos la Tet del medio de cultivo de las células HeLa X1/5 para inducir la síntesis del mRNA de Luc y 4 h después se electroporaron con distintas dosis de EMC-2A. Posteriormente se añadió o no actinomicina D (ActD) a las células transfectadas para inhibir la transcripción. Así, en ausencia de ActD el mRNA de Luc se sintetiza continuamente, mientras que en las células tratadas con ActD todos los mRNAs de Luc presentes en las células fueron producidos previamente a la adición del compuesto (Figura 17A). Tras 4 h de incubación se midió la actividad Luc de los distintos extractos. Mientras que en las células no tratadas con ActD se requirió tan sólo la transfección de 0,1 µg de EMC-2A para bloquear significativamente la síntesis de Luc, se necesitaron 9 µg para hacer lo propio en las células tratadas con ActD (Figura 17B). Por tanto, se requiere 90 veces más cantidad de EMC-2A para inhibir la traducción de una población pre-existente de mRNAs de Luc que para inhibir la traducción de los mismos mRNAs producidos *de novo*. Curiosamente, la electroporación con

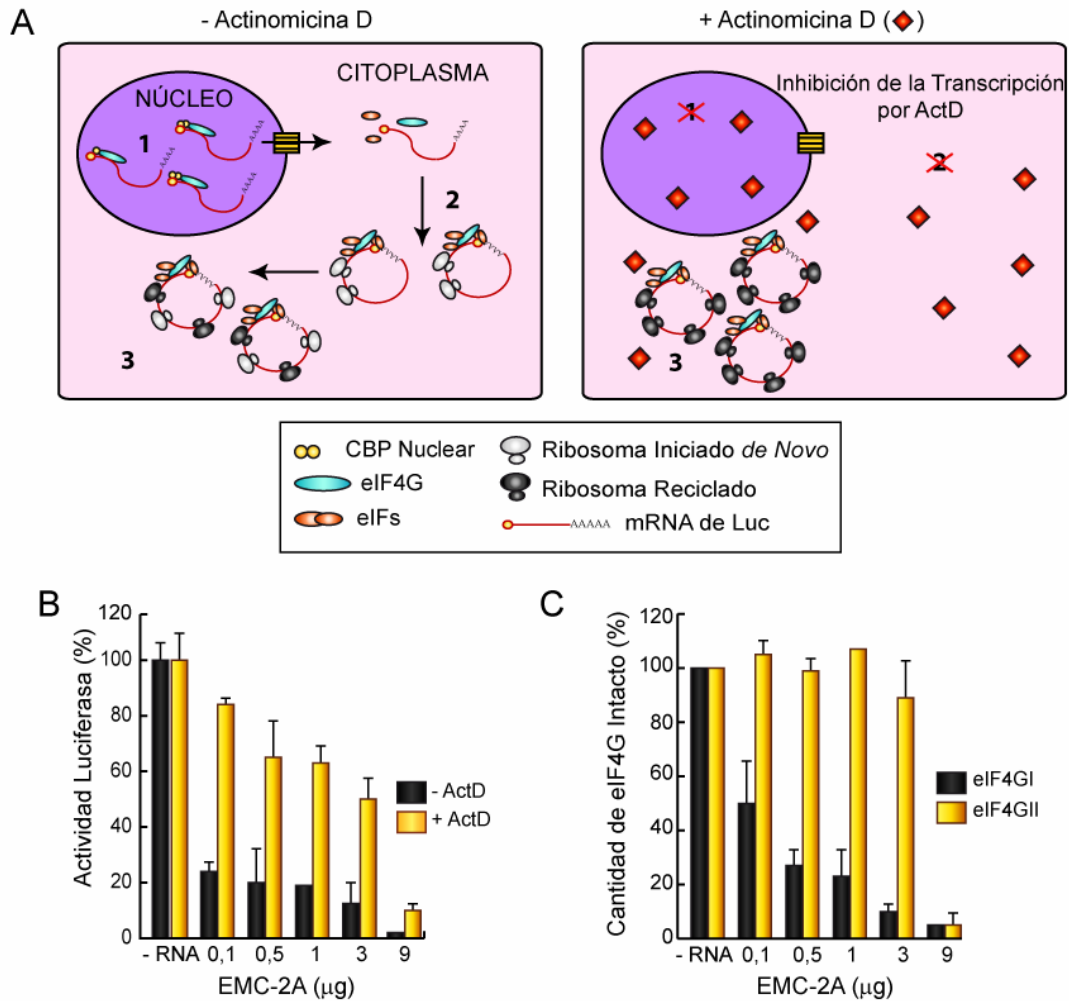


Figura 17. Traducción del mRNA de luciferasa sintetizado *de novo* o pre-existente en presencia de 2A^{pro}. Se retiró la Tet del medio a las células HeLa X1/5 mediante 3 lavados con medio sin antibiótico. A las 4 h post inducción, se electroporaron con 0,1, 0,5, 1, 3 ó 9 µg de EMC-2A o tampón de transcripción como control. Inmediatamente después, se añadió o no ActD. Las muestras fueron analizadas a las 4 hpe. A) En ausencia de ActD el mRNA de Luc se produce continuamente y debe iniciar su traducción (panel izquierdo). En presencia de ActD se bloquea la transcripción (panel derecho). B) Valores relativos de actividad Luc obtenidos en ausencia o presencia de ActD. C) Cantidad relativa de eIF4GI y eIF4GII no proteolizado. ActD, actinomicina D.

0,1 µg de EMC-2A indujo la proteólisis de más del 50% de eIF4GI. Dicha cantidad fue incrementándose gradualmente de forma dependiente de dosis (Figura 17C). En cambio, eIF4GII se mantuvo intacto en todas las muestras salvo en la procedente de la transfección con 9 µg de EMC-2A (Figura 17C).

Estos datos sugieren que los mRNAs de Luc producidos *de novo* son estrictamente dependientes del eIF4GI, mientras que aquellos ya presentes en el citoplasma celular y asociados a los ribosomas requieren una mayor expresión de la proteasa viral y, con ello, el corte adicional de la forma II de eIF4G.

3.1.4. Repercusión de la hidrólisis de eIF4GI y eIF4GII en la traducción de distintas variantes de mRNAs de luciferasa transcritos *in vitro*.

El siguiente objetivo fue estudiar el comportamiento en traducción de mRNAs exógenos de Luc en condiciones de corte diferencial de eIF4GI y eIF4GII. En particular, nuestro interés se centró en analizar el efecto de la hidrólisis de estos factores en la traducción sustentada por la estructura *cap* o la cola de poli(A). Para ello se produjeron *in vitro* mRNAs de Luc que disponían o no de estas estructuras: un mRNA con estructura *cap* (+/-), con *cap* y con poli(A) (+/+), un mRNA sólo poliadenilado (-/+) y un mRNA sin ninguna modificación (-/-) (Figura 18A). Para transfectar simultáneamente distintas dosis de EMC-2A y una cantidad fija de cada variante de Luc, se hicieron mezclas de ambos mRNAs. Para validar el ensayo, co-electroporamos células HeLa con 9 µg del mRNA de Luc (+/-) con tampón de transcripción, 1 ó 9 µg del mRNA EMC-2A. Después, se cuantificó por RT-PCR a tiempo real el mRNA de Luc presente en las células HeLa a las 4 hpe, dado que las fluctuaciones en la cantidad de este mRNA en las células transfectadas podrían alterar notablemente los resultados. Como se observa en la gráfica 17B el grado de transfección del mRNA de Luc fue muy homogéneo en todos los casos. Este resultado se reprodujo en 3 ocasiones, por lo que se puede concluir que este método de transfección de mRNAs exógenos posee una gran reproducibilidad.

Una vez validado el ensayo se co-electroporaron células HeLa con 9 µg de cada variante del mRNA de Luc [(+/-), (+/+), (-/+) y (-/-)] con 1 ó 9 µg del mRNA EMC-2A. Se recogieron las células a las 4, 6 y 8 hpe y se analizó la actividad Luc de cada extracto. Para interpretar correctamente los resultados hay que tener presente dos cosas: i) Los mRNAs son transcritos *in vitro* y transfectados directamente en el citoplasma de las células, lo cual implica que estos mRNAs no están sujetos a los pasos en la expresión génica previos a la traducción, como la transcripción, el procesamiento de los intrones (*splicing*) o la exportación al citoplasma. ii) Los mRNAs Luc y EMC-2A penetran simultáneamente en la célula y, con ello, en la maquinaria de síntesis de proteínas. De esta forma, cuando se produce la proteasa del PV, los mRNAs de Luc ya están sometidos a procesos de traducción. Por tanto, los mRNAs de Luc pueden ser considerados como pre-existentes (mirar apartado 2.1.2).

La estructura *cap* y la cola de poli(A) participan en la iniciación de la traducción al ser reconocidos por eIF4E y PABP, respectivamente (Imataka, H. y col., 1998, Mader, S. y col., 1995). Así, tanto el mRNA de Luc (+/-) como el (-/+) se tradujeron más eficazmente que el mRNA (-/-) (Figura 18, C, E y F). No obstante, la estructura *cap* produjo una iniciación de la traducción 5 veces más eficaz que la cola de poli(A) (Figura 18C y F). Por otro lado, la síntesis de Luc a partir del mRNA (+/+) fue significativamente superior a la suma de la obtenida de los mRNAs (+/-) y (-/+) (Figura 18, C, D y F). Este dato implica que existe un fuerte sinergismo (~7 veces) entre la iniciación de la traducción dependiente del *cap* y de la cola de poli(A). El

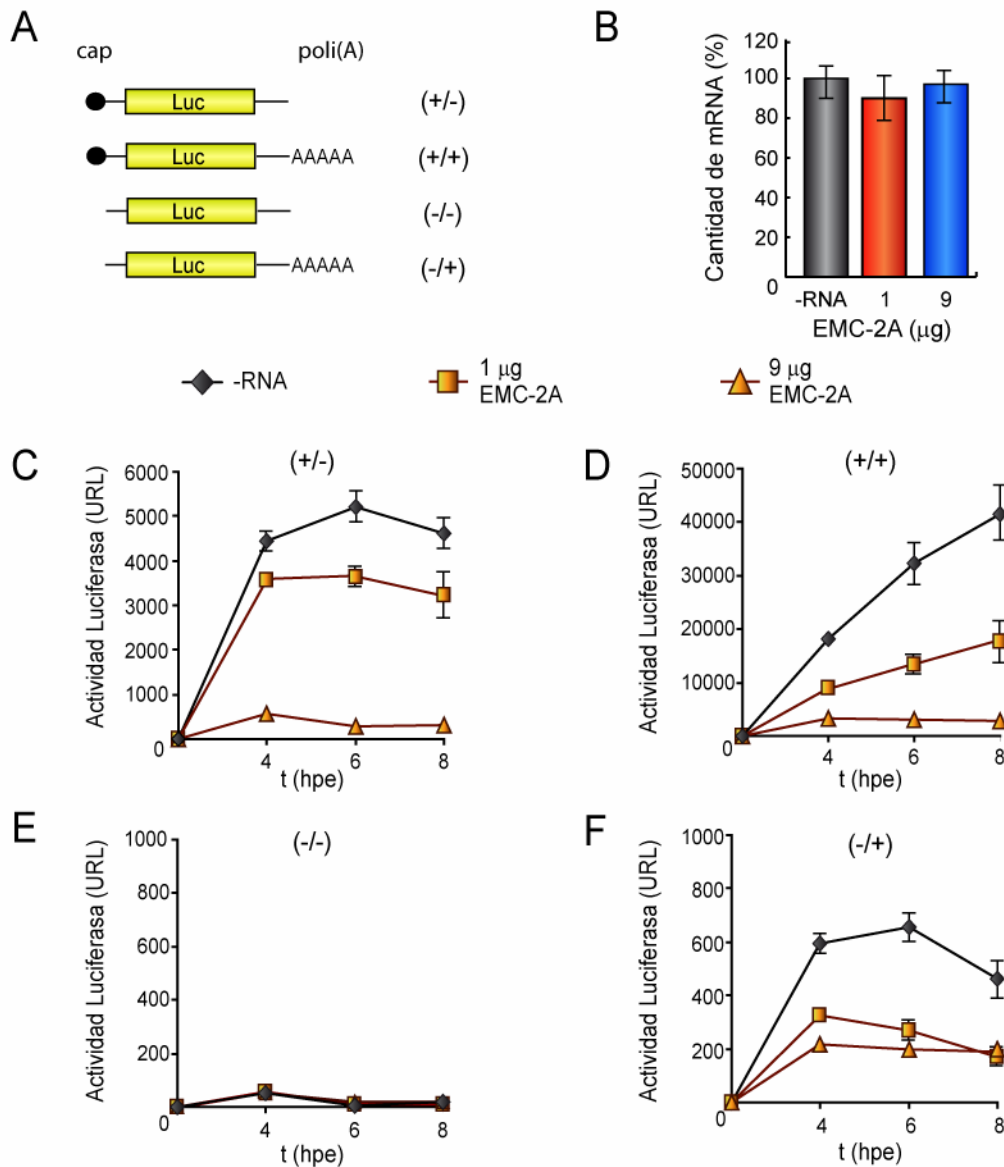


Figura 18. Co-electroporación de mRNAs de luciferasa con EMC-2A. A) Esquema de los mRNAs de Luc sintetizados *in vitro*. B) Se electroporaron células HeLa con 9 μg del mRNA de Luc (+/-) junto con 1 ó 9 μg de EMC-2A o tampón de transcripción como control. A las 2 hpe se aisló el RNA y se cuantificó el mRNA de Luc por RT-PCR a tiempo real. C, D, E y F) Por otro lado, Se electroporaron células HeLa con 9 μg del mRNA de Luc (+/-) junto con 1 ó 9 μg de EMC-2A o tampón de transcripción como control y se recogieron en tampón de Luc a las 4, 6 y 8 hpe. La actividad Luc obtenida de las células electroporadas con los mRNAs de Luc (+/-) (C), (+/+) (D), (-/-) (E), (-/+) (F) se representó en una gráfica.

orden de los mRNAs respecto a su capacidad para traducirse en células HeLa fue: (+/+) > (+/-) > (-/+) > (-/-).

De acuerdo con los experimentos anteriores, la electroporación con 1 μg de EMC-2A indujo una hidrólisis casi total de eIF4GI a partir de las 4 hpe. En cambio, usando 9 μg del mismo mRNA se obtuvo un corte casi total a esa hpe de eIF4GI y eIF4GII (datos no mostrados). La hidrólisis de eIF4GI por 2A^{pro} apenas afectó a la traducción del mRNA de Luc (+/-). Por el contrario, el corte de eIF4GI y eIF4GII resultó en una inhibición total de la síntesis de Luc a partir de ese mRNA (Figura 18C). Por tanto, para bloquear la iniciación de la traducción dependiente de la estructura *cap* de los mRNAs asociados con los ribosomas se

requiere el corte de las dos formas de eIF4G. La traducción del mRNA de Luc (+/+) fue parcialmente inhibida (40-55%) por el corte de eIF4GI, mientras que el corte de eIF4GI y eIF4GII la bloqueó completamente (Figura 18D). Por tanto, 2A^{pro} es capaz de inhibir la traducción de mRNAs que disponen de estructura *cap* y cola de poli(A). Coherentemente, el mRNA (-/-) fue incapaz de competir con los mRNAs celulares por la maquinaria de traducción, no detectándose apenas actividad Luc en ningún caso (Figura 18E). Este resultado demuestra que aunque estos mRNAs artificiales pueden ser traducidos *in vitro* en extractos celulares (Novoa, I. y col., 1997), son completamente inoperantes en condiciones de competición con los mRNAs celulares (Figura 18E). Finalmente, la traducción del mRNA (-/+) fue inhibida (~60-70%) en las células que expresaban 2A^{pro} (Figura 18F), sugiriendo que la proteólisis de eIF4G puede impedir la traducción dependiente de la cola de poli(A).

Por tanto, el corte de eIF4GI y eIF4GII por 2A^{pro} supone la inhibición de la traducción dependiente de *cap* y de cola de poli(A) y, con ello, del sinergismo traduccional entre ambas estructuras.

3.1.5. Estudio de la iniciación de la traducción en células transfectadas con EMC-2A.

Los datos descritos anteriormente sugieren que eIF4GI es imprescindible para los eventos tempranos de traducción del mRNA de Luc en células HeLa X1/5, pero no lo es para la traducción de los mRNAs asociados con los ribosomas (Figura 17). Para intentar determinar si el papel de eIF4GI está estrechamente ligado a los procesos de iniciación de la traducción citoplásmica (*steady-state complex*), se realizó un ensayo de salida de los polisomas (*run off*) por adición de medio hipertónico. En condiciones de alta concentración de NaCl (300 mM) la iniciación de la traducción se inhibe, mientras que la elongación y la terminación tienen lugar. Este tratamiento produce la salida de los ribosomas asociados al mRNA. No obstante, cuando se restaura el medio normal (NaCl 150 mM) los mRNAs vuelven a iniciar su traducción, asociándose de nuevo a los ribosomas (Figura 19A) (Novoa, I. y Carrasco, L., 1999). Así, nuestro siguiente objetivo fue determinar el grado de participación de eIF4GI y eIF4GII en la iniciación de la traducción de los mRNAs celulares tras un choque hipertónico. Para ello, se electroporaron células HeLa con dosis crecientes de EMC-2A, 9 μ g de EMC-2C o tampón de transcripción como control. Después, se analizó la síntesis de proteínas en condiciones normales (8 hpe), durante un choque hipertónico por incremento del NaCl de 150 a 300 mM (10 hpe), y tras restablecer las condiciones normales (12 hpe) (esquema del experimento en la Figura 19B). Previamente al choque hipertónico, la síntesis de proteínas respondió a los patrones observados anteriormente: mientras que la hidrólisis de eIF4GI no produjo apenas ningún efecto en la traducción, el corte de eIF4GI y eIF4GII la inhibió completamente (Figura 19C y D, línea 4 frente a 6). Durante el choque hipertónico no se produjo apenas incorporación de [³⁵S]-Met/Cys en ningún caso (Figura 19C). Sorprendentemente, el corte de eIF4GI no impidió la reasociación

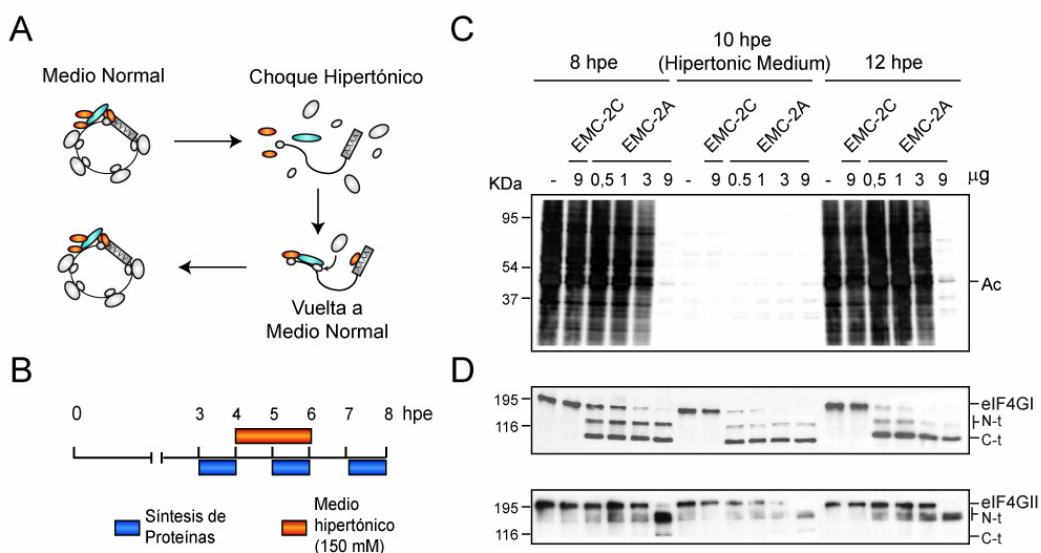


Figura 19. Iniciación de la traducción en células HeLa transfecadas con el mRNA EMC-2A tras un choque hipertónico. Se electroporaron células HeLa con 0,5, 1, 3 ó 9 µg de EMC-2A o tampón de transcripción o 9 µ de EMC-2C como controles. A las 8 hpe se incrementó la concentración de NaCl del medio de cultivo hasta 300 mM y se mantuvo durante 2 h. A las 10 hpe se restablecieron las condiciones normales y se mantuvieron hasta las 12 hpe. Se realizaron marcajes radiactivos de proteínas de las horas 7-8, 9-10 y 11-12. A) Esquema del efecto del medio hipertónico en la traducción. B) Representación esquemática del experimento. C) Fluorografía y autorradiografía. D) *Western blots* realizado con anticuerpos frente a eIF4GI (panel superior) y eIF4GII (panel inferior).

de los mRNAs con los ribosomas una vez restaurado el medio normal (Figura 19C y D, líneas 15, 16 y 17). En cambio, en las células en las que eIF4GI y eIF4GII estaban hidrolizados la síntesis continuó inhibida en una proporción similar a la observada antes del choque hipertónico (Figura 19B y C, líneas 6 y 18).

Estos datos demuestran que la hidrólisis de eIF4GI, por sí misma, es insuficiente para impedir la iniciación de la traducción. Teniendo en cuenta que la población de eIF4GI es de 4 a 10 veces superior a la de eIF4GII (Kuyumcu-Martinez, N.M. y col., 2004), parece sorprendente que el corte de eIF4GI no inhiba, al menos parcialmente, la iniciación de la traducción. Por tanto, la participación de eIF4GII en este proceso podría ser superior a la de eIF4GI.

3.1.6. Efecto del corte de eIF4GI y eIF4GII en la traducción dirigida por los IRES de picornavirus.

Los mRNAs de picornavirus no poseen *cap* e inician su traducción por un mecanismo no canónico, gracias a que contienen IRES. Los IRES de picornavirus se han clasificado en tipo I, II o III en función de su estructura primaria, secundaria y los requerimientos para su traducción óptima en RRL (Martinez-Salas, E. y Fernandez-Miragall, O., 2004). Estos mRNAs se traducen en células en las que eIF4G está hidrolizado (Ziegler, E. y col., 1995a). Aunque los mRNAs de picornavirus no disponen de *cap*, si que cuentan con colas de poli(A). La presencia de esta estructura estimula también la traducción dirigida por los IRES de picornavirus (Bradrick, S.S. y col., 2007). Así, nuestro siguiente objetivo se centró en determinar el efecto del corte de

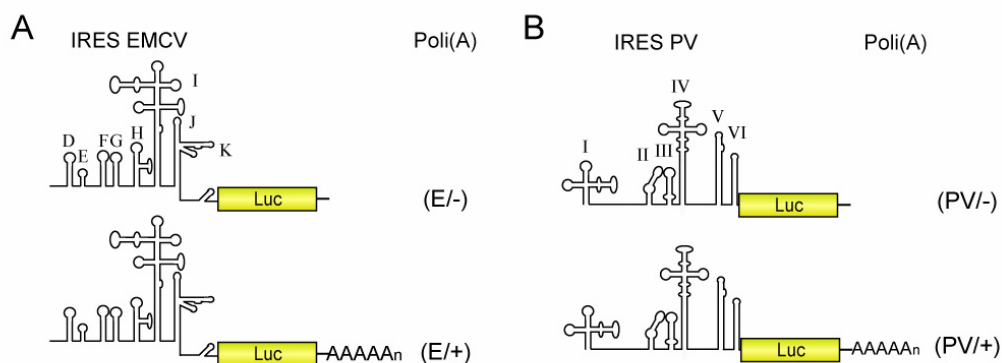


Figura 20. Esquema de los mRNAs de luciferasa que contienen IRES de picornavirus. A) mRNAs de Luc que contienen el IRES de EMCV, no poliadenilado (E/-) o poliadenilado (E/+). B) mRNAs de Luc que contienen el IRES de PV en su versión sin (PV/-) y con poli(A) (PV/+).

eIF4GI y eIF4GII en la traducción dirigida por IRES de picornavirus. Además, quisimos analizar la contribución de la cola de poli(A) a la traducción de estos mRNAs virales. Para ello se transcribieron *in vitro* dos mRNAs de Luc: uno que contiene el IRES de EMCV (tipo II) y otro el de PV (tipo I), a los que se denominan (E/-) y (P/-), respectivamente (Figura 20). Por otro lado, estos mRNAs se poliadenilaron *in vitro* obteniendo las versiones poli(A)⁺ (E/+) y (P/+) (Figura 20). Se co-electroporaron células HeLa con 9 μ g de los mRNAs (E/-), (E/+), (P/-) y (P/+) con 1 ó 9 μ g de EMC-2A o con tampón de transcripción. Las células se recogieron a las 4, 6 y 8 hpe y se midió la actividad Luc presente en los extractos. En las células control, la traducción de los mRNAs (E/+) y (P/+) se estimuló significativamente por la cola de poli(A), comparada con la obtenida de los mRNAs (E/-) y (P/-) (Figura 21A y B). De acuerdo con lo descrito previamente, en nuestro sistema la cola de poli(A) también contribuye en la traducción dirigida por IRES de picornavirus.

En el caso particular del mRNA (E/-), el corte de eIF4GI, inducido por la transfección de 1 μ g de EMC-2A, no produjo ninguna alteración en la cantidad de Luc sintetizada con respecto a al control (Figura 21A y C). Por el contrario, el corte de eIF4GI y eIF4GII, producido en las células electroporadas con 9 μ g de EMC-2A, dio lugar a una potente estimulación de la traducción del mRNA (E/-) (~5 veces) (Figura 21A y C). Un dato muy interesante es que en esas condiciones el mRNA (E/-) se tradujo con una eficacia similar al (E/+). Por tanto, la estimulación de la traducción dirigida por el IRES de EMCV debida al corte de eIF4G es equivalente en magnitud al aporte en traducción de la cola de poli(A). En contraste, la traducción del mRNA (E/+) no se estimuló significativamente por el corte de eIF4GI y eIF4GII respecto a la obtenida en células control (Figura 21A). La explicación a este efecto reside en el hecho de que la iniciación de la traducción promovida por la cola de poli(A) se inhibe por el corte de eIF4G. Esto implica un descenso de ~5 veces en la capacidad de traducción del mRNA (E/+). Sin embargo, el corte de eIF4GI y II induce una estimulación de la traducción dirigida

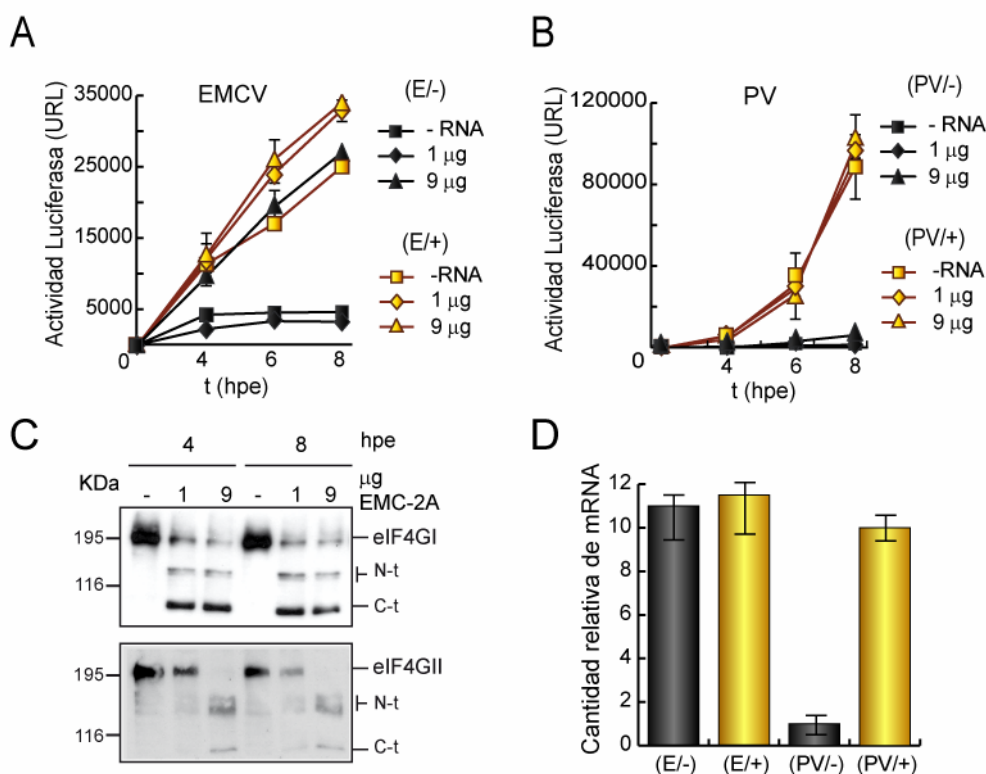


Figura 21. Efecto del corte diferencial de eIF4GI y eIF4GII en la traducción dirigida por IRES de picornavirus. Se co-electroporaron células HeLa con 9 μg de cada mRNA de Luc con IRES de picornavirus [(E/-), (E/+), (PV/-) y (PV/+)] y con 1 ó 9 μg de EMC-2A o con tampón de transcripción. A las 4, 6 y 8 hpe se recogieron las muestras en *tampón* de lisis para Luc. La actividad Luc obtenida tras electroporar los mRNAs (E/-) y (E/+) (A) o (PV/-) (PV/+) (B) fue representada en las respectivas gráficas. C) Análisis de la integridad de eIF4GI y eIF4GII por *western blot* en los extractos. D) En paralelo, se electroporaron por triplicado las células HeLa con 9 μg de cada mRNA de Luc y se sembraron en una placa p60. A las 2 horas se recogieron las células en PBS y se aisló el mRNA. La gráfica representa la cantidad relativa del mRNA de Luc en cada caso. Estos datos fueron obtenidos de dos experimentos independientes, representando las barras de error el intervalo de confianza del 95%.

por el IRES de EMCV de ~5 veces, tal y como se observó con el mRNA (E/-), que es suficiente para contrarrestar la pérdida de la traducción dependiente de la cola de poli(A).

En el caso concreto del IRES de PV, el efecto de 2A^{pro} en la síntesis de Luc fue diferente. Aunque la traducción del mRNA (P/-) fue estimulada por el corte de eIF4GI y eIF4GII (~4 veces), dicha estimulación no fue suficiente como para contrarrestar a la traducción promovida por la cola de poli(A) [(P/+)] (Figura 21B). Tal y como ocurrió con el mRNA (E/+), la síntesis de Luc a partir del mRNA (P/+) no fue afectada en la células transfectadas con 1 ó 9 μg de EMC-2A (Figura 21B). Este dato apoya la observación de que tanto el IRES de EMCV, como el de PV, dirigen la traducción independientemente del estado de eIF4G.

El hecho de que la traducción del mRNA (P/-) no se equiparase a la obtenida con el (P/+) por el corte de eIF4G nos hizo plantearnos la posibilidad de que éste mRNA fuese muy inestable en el citoplasma celular. Para estudiar esta posibilidad se electroporaron células HeLa con 9 μg de los mRNAs (E/-), (E/+), (P/-) o (P/+) y se aisló el RNA total a las 2 hpe. Después, se cuantificó el mRNA de Luc presente en cada extracto por RT-PCR a tiempo real. Mientras

que los mRNAs (E/-), (E/+) y (P/+) estaban representados en las muestras en cantidades similares, la proporción del mRNA (P/-) era ~10 veces inferior (Figura 22D). Por tanto, el mRNA (P/-) es muy inestable en las células HeLa. Este resultado es ampliamente comentado en la Discusión.

3.1.7. Efecto del corte de eIF4GI y eIF4GII en la traducción del mRNA de Hsp70.

En los últimos años se han descrito varios mRNAs celulares que son capaces de traducirse de manera independiente de *cap*. Este es el caso del mRNA Hsp70, que se traduce con mayor eficacia bajo condiciones de choque térmico, donde es parcialmente resistente al corte de eIF4G (Novoa, I. y Carrasco, L., 1999). Sin embargo, no está claro si este mRNA posee un IRES o se traduce por un mecanismo alternativo de salto o *shunting*, que es preferente a altas temperaturas (42°) (Rubtsova, M.P. y col., 2003, Yueh, A. y Schneider, R.J., 2000). Con el fin de estudiar el efecto del corte de eIF4GI y eIF4GII por 2A^{Pro} en la traducción de un mRNA celular atípico, como el Hsp70, se electroporaron células HeLa con dosis crecientes de EMC-2A, usando 9 µg de EMC-2C o tampón de transcripción como controles, y se sometieron a un choque térmico (42°C) a las 5 hpe (Esquema del experimento en la Figura 22A). Este protocolo asegura que el corte de eIF4G ocurra previamente a la inducción del mRNA de Hsp70. A las 4 y 8 hpe se recogieron las células y los extractos se analizaron. El choque térmico generó una fuerte

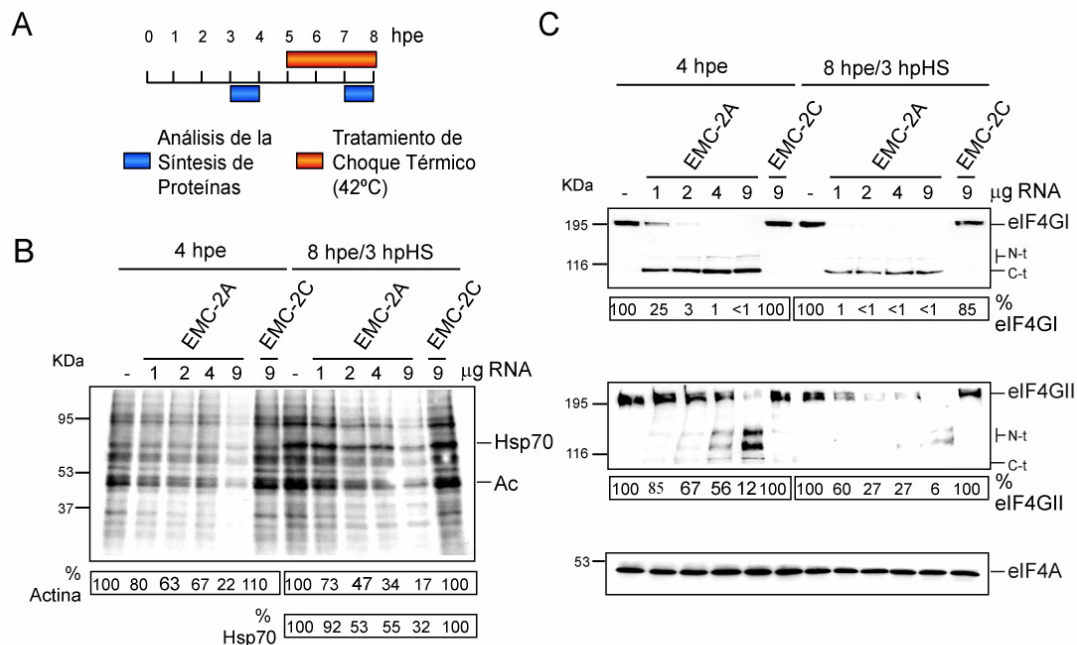


Figura 22. Efecto del corte diferencial de eIF4GI y eIF4GII en la traducción del mRNA de Hsp70. Se electroporaron células HeLa con 1, 2, 4 ó 9 µg de EMC-2A o con tampón de transcripción o 9 µg de EMC-2C como controles. A las 5 hpe las células se sometieron a un choque térmico de 3 h a 42°C. Se realizaron marcajes radiactivos de proteínas de la 3ª a la 4ª hpe y de la 7ª a la 8ª. A) Representación esquemática del experimento. B) Fluorografía y autorradiografía. C) *Western blots* realizados con anticuerpos frente a eIF4GI (panel superior), eIF4GII (panel intermedio) y eIF4A (panel inferior).

inducción de la proteína Hsp70 respecto de las células recogidas a 37°C a las 4 hpe (Figura 22B, línea 1 frente a 7). La transfección de 1 µg de EMC-2A fue suficiente para producir una hidrólisis total del eIF4GI, permaneciendo eIF4GII intacto (Figura 22C). En esas condiciones la síntesis de la Hsp70 fue similar a la observada en las células control, mientras que la de actina sufrió una inhibición parcial de un 30% (Figura 22B). La producción de actina y Hsp70 se inhibió paulatinamente conforme se hidrolizaba el eIF4GII (Figura 22B y C). Independientemente de la dosis de EMC-2A empleada, la inhibición de la síntesis de Hsp70 fue menor que la de la actina (Figura 22B). En conclusión, la traducción de un mRNA de estrés

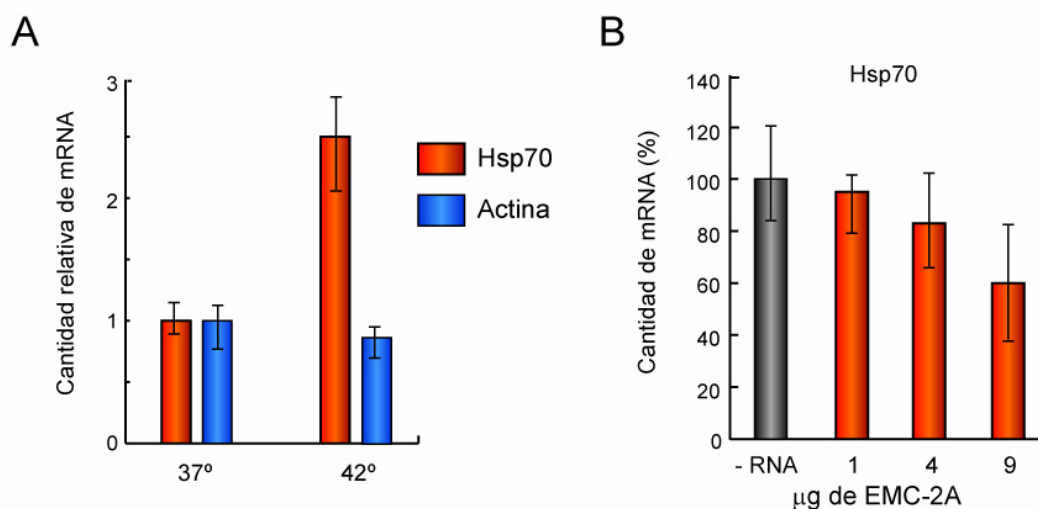


Figura 23. Análisis de la cantidad del mRNA de Hsp70. En paralelo al experimento anterior, se electroporaron células HeLa con 1, 4 ó 9 µg de EMC-2A o con tampón de transcripción como control y se sembraron. A las 5 hpe se sometieron a un choque térmico de 3 h a 42°C. Las células se recogieron en PBS a las 4 y 8 hpe y se aisló el RNA total. A) Análisis por RT-PCR a tiempo real de la cantidad relativa del mRNA de Hsp70 y de actina en las células control sometidas al choque térmico comparada con la obtenida previamente al choque. B) Representación de la cantidad relativa del mRNA de Hsp70 a las 8 hpe en relación con las distintas dosis de EMC-2A. Los datos se obtuvieron de dos experimentos independientes, representando las barras de error el intervalo de confianza del 95%.

como el Hsp70 es más resistente a la hidrólisis de eIF4G que la de los mRNAs normales, como el de actina.

Para determinar si la inhibición de la síntesis de la Hsp70 en las células transfectadas con 9 µg del mRNA EMC-2A era debida a un descenso en las cantidades del mRNA Hsp70, se aisló la población total de RNA y se cuantificó este mRNA por RT-PCR a tiempo real. Era de esperar que un fuerte incremento en la producción de Hsp70 a 42°C respecto a 37°C (cerca de 100 veces), fuera debido a una potente inducción de la transcripción de su mRNA. Sin embargo, el incremento en la cantidad del mRNA de Hsp70 sólo fue de 2,5 veces (Figura 23A). Este dato sugiere que el principal evento implicado en la estimulación de la expresión de Hsp70 a 42°C no es la transcripción sino la traducción de su mRNA. La cantidad del mRNA Hsp70 disminuyó progresivamente correlacionando con el aumento de la dosis de EMC-2A empleada (Figura 23B). De modo, que la dosis más alta (9 µg) indujo una disminución del 40-50% (Figura 23B).

Este dato sustenta la observación de que 2A^{pro} inhibe transcripción del mRNA de Hsp70 (Novoa, I. y Carrasco, L., 1999).

Para intentar separar el efecto de la 2A^{pro} en transcripción del producido en traducción, decidimos emplear los mutantes (M) puntuales de la proteasa D135N (M6) y V119M (M7), que bloquean de manera ineficaz la transcripción (Ventoso, I. y col., 1998). Para ello, se transcribieron *in vitro* los mRNAs EMC-2AM6 y EMC-2AM7 usando como moldes los plásmidos pTM1-2AM6 y pTM1-2AM7. Además, se transcribió el mRNA EMC-2AM15, que codifica un mutante inactivo de 2A y que fue descrito en el apartado 3.1.1. Por tanto, se electroporaron 1 ó 9 μ g de los mRNAs EMC-2A, EMC-2AM6, EMC-2AM7, EMC-2AM15 o mezcla de reacción como control. A las 5 hpe las células se sometieron a un choque térmico a 42°C, recogiendo las muestras a las 4 y 8 hpe. En las células transfectadas con la dosis baja de estos mRNAs no se observó ningún efecto en la síntesis de Hsp70 ni en la de actina (Figura 24A, líneas 10, 12 y 14). En cambio, la transfección con 9 μ g de los mRNAs indujo una inhibición casi total de la síntesis de proteínas salvo en el caso de EMC-2AM15. De nuevo, la traducción del mRNA de Hsp70 se inhibió en menor medida que la del mRNA de actina (Figura 24A, líneas 11, 13 y 15). Las variantes M6 y M7 de 2A^{pro} hidrolizaron eIF4GI y eIF4GII de forma dependiente de la dosis de mRNA usada en la electroporación, tal y como sucedió con la proteasa salvaje (Figura 24B). En cambio, el M15 no indujo el corte de los factores de iniciación de la traducción.

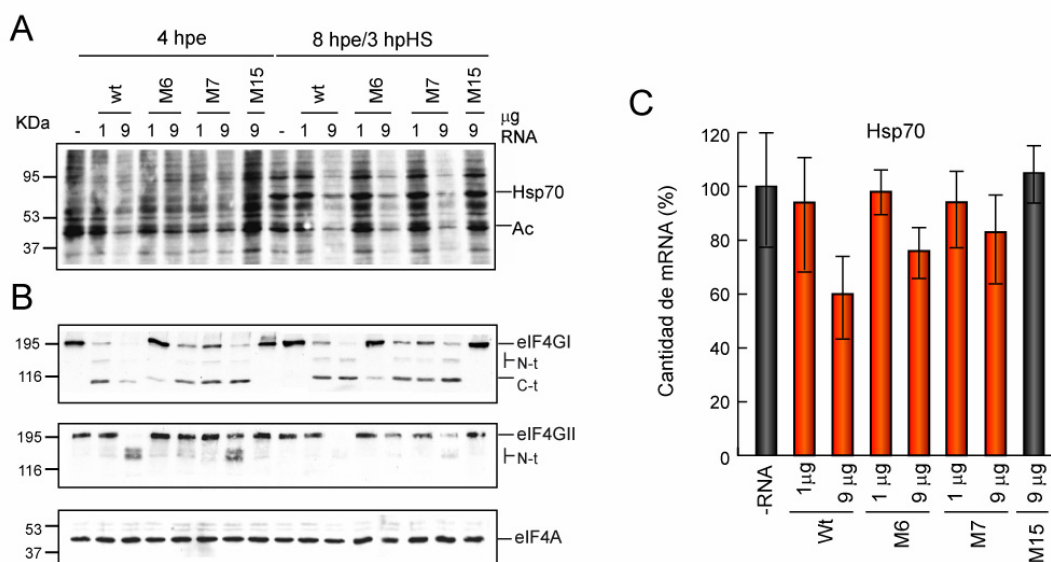


Figura 24. Efecto de los mutantes M6 y M7 de 2A^{pro} en la síntesis de Hsp70. Se electroporaron células HeLa con 1 ó 9 μ g de los mRNAs EMC-2A, EMC-2AM6, EMC-2AM7 o EMC-2AM15 o con tampón de transcripción como control. A las 5 hpe las células se sometieron a un choque térmico de 3 h a 42°C. Se realizaron marcajes radiactivos de proteínas de la 3^a a la 4^a hpe y de la 7^a a la 9^a. A) Fluorografía y autorradiografía. B) *Western blots* realizados con los anticuerpos frente a eIF4GI (panel superior), eIF4GII (panel intermedio) y eIF4A (panel inferior). C) En paralelo se aisló a las 8 hpe el RNA total de células electroporadas con los mRNAs anteriores. La gráfica representa las cantidades relativas del mRNA de Hsp70 en dichas células. Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95%.

En paralelo se cuantificó el mRNA de Hsp70 presente en las células transfectadas por RT-PCR a tiempo real. La cantidad de este mRNA disminuyó cerca del 40% en las células electroporadas con 9 μ g de EMC-2A con respecto a los controles. Por el contrario, esa misma dosis de los mRNAs EMC-2AM6 y M7 sólo produjo un descenso del 10-20% (Figura 24C). Por tanto, este dato confirma que 2A^{pro} es capaz de inhibir la traducción del mRNA Hsp70 independientemente de las alteraciones producidas en la transcripción de su mRNA.

En conclusión, el corte de eIF4GI y eIF4GII inhibe la traducción de un mRNA de estrés celular como el de Hsp70. No obstante, la magnitud de esta inhibición es menor a la observada con otros mRNAs celulares como el de actina.

3.1.8. Correlación de la inhibición de la síntesis de proteínas celulares con la proteólisis de eIF4GII en células BHK.

Uno de nuestros siguientes objetivos fue analizar los efectos de EMC-2A sobre la síntesis de proteínas en otra línea celular de mamífero. Para tal fin, se emplearon células BHK. Se electroporaron estas células con dosis crecientes de EMC-2A y, a las 8 hpe, se analizó en paralelo la síntesis de proteínas en las células incubadas a 37°C durante todo el experimento o a 42°C durante las 3 últimas horas (5-8 hpe) (Figura 25). Como ocurrió en células HeLa, la inhibición de la síntesis de proteínas fue dependiente de la dosis de EMC-2A empleada (Figura 25A, líneas 7 y 14 y 25D). Sorprendentemente, mientras que en células HeLa eIF4GI es más susceptible a la hidrólisis por 2A^{pro} que eIF4GII, en células BHK este factor mostró una gran resistencia a la proteólisis (Figura 25B y D). Así, en BHK se requirió una dosis similar de EMC-2A a la empleada en células HeLa para inducir el corte de eIF4GII, pero se necesitó una dosis 20 veces superior para cortar eIF4GI (Figuras 15B frente a 25D). Nótese que el anticuerpo frente a eIF4GI reconoció una proteína específica de 150 KDa (p150) que desapareció en presencia de 2A^{pro} (Figura 25B). Dicha proteína se corresponde con el tamaño estimado para eIF4G y podría tratarse de una población de este factor que no ha sufrido modificaciones post-traduccionales o bien, un producto de proteólisis generado por una proteasa celular (Prevot, D. y col., 2003). 2A^{pro} tampoco hidrolizó PABP en esta línea celular (Figura 25C). Por tanto, la inhibición de la síntesis de proteínas, cuantificada en relación a la cantidad de actina y Hsp70 producida, correlacionó con la hidrólisis de eIF4GII (Figura 25A, B y D).

Estos sorprendentes resultados sugieren que el eIF4GII soporta en mayor medida la traducción de los mRNAs asociados con los ribosomas en nuestras condiciones experimentales. No obstante, la inhibición de la síntesis de proteínas es completa sólo cuando ambas formas de eIF4G están cortadas. El hecho de que la síntesis de Hsp70 se inhiba en paralelo al corte de eIF4GII sugiere que este factor es esencial para la traducción del mRNA de estrés celular. Cabe

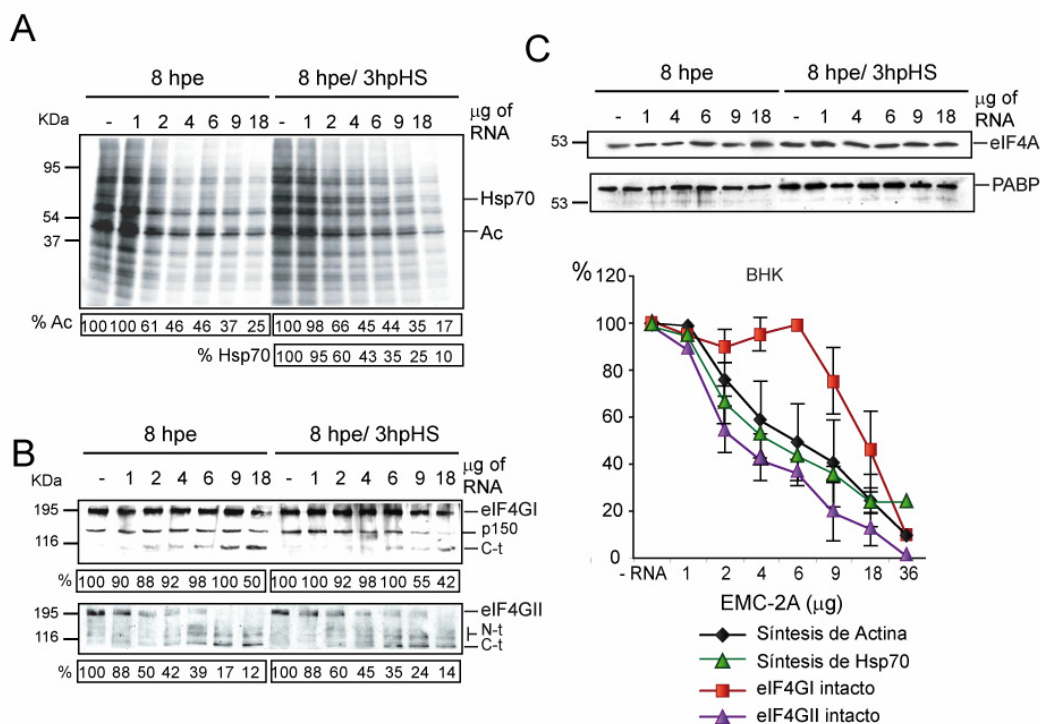


Figura 25. Efecto del mRNA EMC-2A en células BHK. Se electroporaron por duplicado células BHK con 1, 2, 4, 6, 9 ó 18 μg de EMC-2A o con tampón de transcripción como control. La mitad de las células se incubaron durante todo el experimento a 37°C, mientras que la otra mitad se incubó a 42°C de la hpe 5 a la 8. Se realizaron marcajes radiactivos de proteínas de la 7ª a la 9ª hpe. A) Fluorografía y autorradiografía. B) Western blots con los anticuerpos frente a eIF4GI (panel superior), eIF4GII (panel inferior). C) Western blots usando anticuerpos frente a eIF4A (panel superior) y PABP (panel inferior). D) Representación comparativa de la cantidad de eIF4GI y eIF4GII intactos y de la síntesis de actina y de Hsp70 en células BHK a las 8 hpe, en relación con la dosis de EMC-2A empleada. Los resultados fueron obtenidos de 3 experimentos independientes.

destacar que la inhibición de la traducción del mRNA de Hsp70 es similar a la obtenida con el mRNA de actina en células BHK, en contra de lo observado en células HeLa.

3.1.9. Depleción de las proteínas de la familia eIF4G en células humanas.

Según los resultados anteriores, eIF4GI y eIF4GII podrían desempeñar un papel diferente en la iniciación de la traducción. Para disminuir la cantidad de uno u otro factor en células en cultivos y observar sus efectos en la síntesis de proteínas nos propusimos emplear siRNAs. Los siRNAs son secuencias cortas de RNA (aprox. 21 nt), complementarias a la secuencia del mRNA de la proteína que se quiere eliminar. La hibridación del mRNA diana con los siRNAs conlleva la degradación del primero en los cuerpos de procesamiento (P-bodies) por la maquinaria celular. La ausencia del mRNA interferido en las células transfectadas produce una pérdida paulatina de la proteína en cuestión por la falta de recambio. Aunque esta estrategia ha sido empleada previamente para depletar eIF4GI en células en cultivo, los resultados no fueron concluyentes (Coldwell, M.J. y Morley, S.J., 2006). En consecuencia, intentamos producir un descenso específico en las células de la cantidad de las distintas proteínas que componen la familia eIF4G (eIF4GI, eIF4GII y NAT1/DAP5/p97) transfectando siRNAs y determinar sus efectos en la síntesis de proteínas. Para ello se diseñaron 3 siRNAs frente al mRNA de eIF4GI

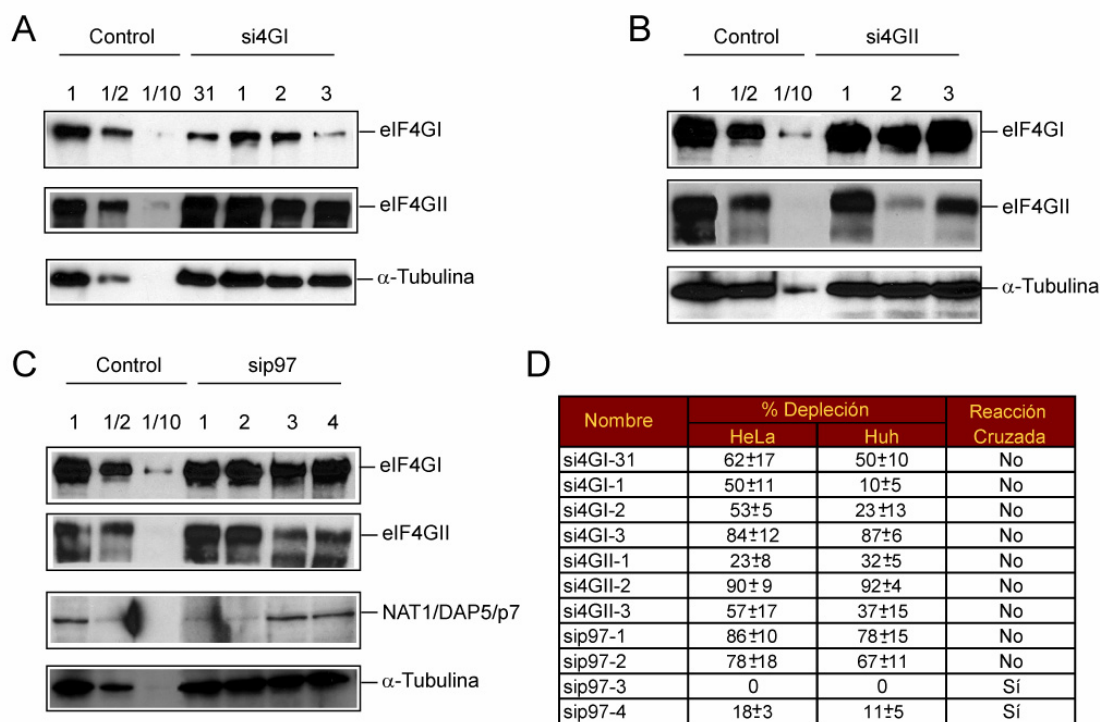


Figura 26. Depleción de eIFs mediante siRNAs en células humanas. Se realizó una transfección doble (a las 0 y 24h) de células HeLa con 25 pmoles de cada siRNA usando lipofectina 2000. A las 48 hpt se recogieron las células y se analizaron los extractos por *western blots* usando anticuerpos frente a eIF4GI, eIF4GII, NAT1/DAP5/p97 y α -Tubulina. De las células transfectadas con el siControl, se hicieron diluciones 1, 1/2 y 1/10 para cuantificar la cantidad total de cada proteína. Los paneles muestran los *western blots* de los extractos de las células transfectadas con los siRNAs frente a eIF4GI (A), eIF4GII (B) o NAT1/DAP5/p97 (C). D) Tabla resumen que muestra el % de depleción media del factor diana usando cada siRNA en células HeLa y Huh. La D.E. se obtuvo a partir de 3 experimentos en células HeLa y 2 en Huh.

(si4GI-1, -2 y -3), otros tres frente al de eIF4GII (si4GII-1, -2 y -3) y, por último, 4 contra el mRNA de NAT1/DAP-5/p97, factor implicado en la síntesis de proteínas durante la apoptosis o el estrés de retículo (Tabla 2) (Lewis, S.M. y col., 2007, Nevins, T.A. y col., 2003). Además, se obtuvo el siRNA previamente descrito contra el mRNA de eIF4GI (si4GI-31) (Coldwell, M.J. y Morley, S.J., 2006). Para testar la eficacia de los siRNAs, se transfectaron 25 pmoles de cada uno en células HeLa y Huh, usando lipofectamina 2000. Se realizaron dos transfecciones consecutivas, la primera en el momento de inicio del experimento y la segunda 24 h más tarde. Para analizar el grado de transfección obtenido, se fijaron las células transfectadas con el siRNA negativo (siControl), que está unido a fluoresceína, 4 horas después de la segunda transfección. El análisis por microscopía de fluorescencia reveló que más del 95% de las células contenían el siControl en su citoplasma (datos no mostrados). 48 h después de la primera transfección se recogieron las células y se analizó por *western blot* la cantidad de eIF4GI, eIF4GII y NAT1/DAP5/p97 presente en los extractos. Entre los siRNAs diseñados frente al mRNA de eIF4GI destacó el si4GI-3, que indujo más de un 85% de disminución en la cantidad total del factor, tanto en células HeLa como en Huh. Además, el si4GI-3 fue más eficaz que el si4GI-31, previamente descrito (Figura 26A y D). La actividad del si4GI-3 fue específica, ya que la cantidad de eIF4GII o de α -Tubulina se mantuvo constante en esos extractos (Figura 26A).

En el caso de eIF4GII, el siRNA que produjo mejores resultados fue el si4GII-2, que indujo una disminución superior al 80% de esta proteína en las células HeLa y Huh transfectadas (Figura 26B y D). La actividad de este siRNA fue también muy específica, ya que la cantidad de eIF4GI o de α -Tubulina no sufrió variaciones (Figura 26B).

Por último, la transfección de los siRNAs sip97-1 y -2 dio lugar a una fuerte disminución en la cantidad total del factor NAT1/DAP5/p97 en los dos tipos celulares (Figura 26C y D). La interferencia de estos siRNAs fue específica también, puesto que no produjeron disminuciones en la cantidad del resto de proteínas analizadas (Figura 26C).

Por tanto, se seleccionaron para los siguientes experimentos los siRNAs si4GI-3, si4GII-2 y sip97-1 por su capacidad de inducir un descenso específico y significativo en células humanas de los factores eIF4GI, eIF4GII y NAT1/DAP5/p97, respectivamente (Figura 26D).

Para refrendar la eficacia de los siRNAs seleccionados se detectaron los factores de iniciación por inmunofluorescencia. Para ello, se transfectaron en el momento de inicio del experimento y a las 24 h con los siRNAs siControl, si4GI-3 y si4GII-2. A las 72 h tras la primera transfección se fijaron las células y se procesaron con los anticuerpos frente a la región C-t de eIF4GI o eIF4GII. Finalmente, se visualizaron las células por microscopía confocal de

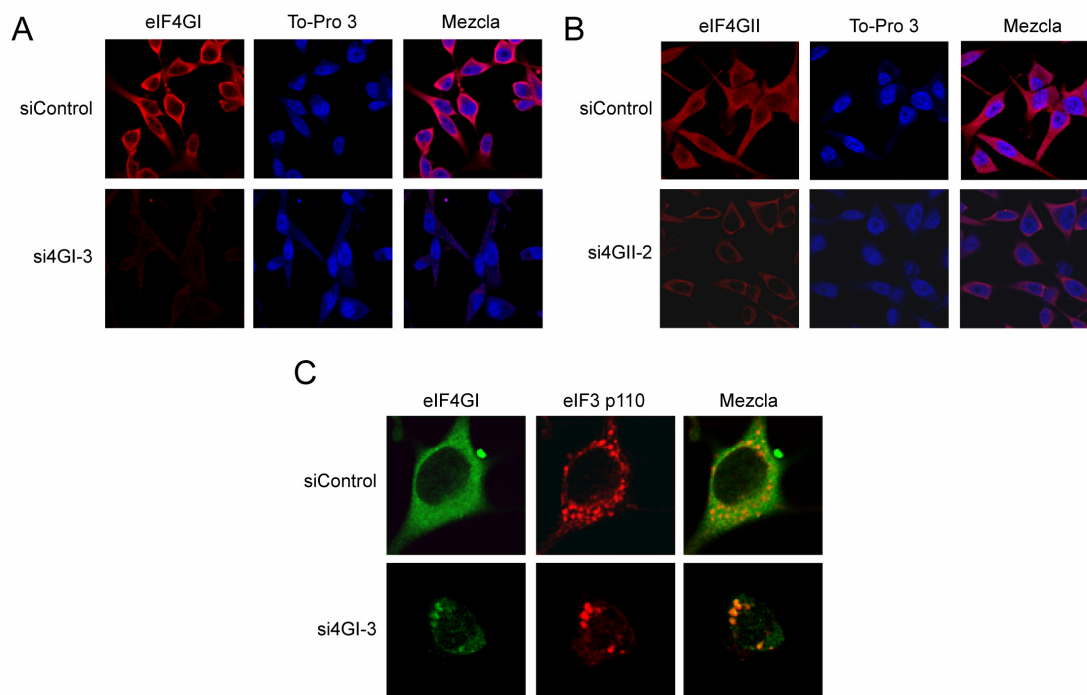


Figura 27. Inmunodetección de eIF4GI y eIF4GII en células transfectadas con los siRNAs. Se transfectaron células HeLa a las 0 y 24 h con los siRNAs si4GI-3 y si4GII-2 y se incubaron en medio con suero al 1%. A las 72 h se fijaron las células y se procesaron para inmunofluorescencia. Después se observaron con un microscopio *Radiance 2000*, utilizando el objetivo *63x/1.4 oil Plan-Apochromat (Zeiss)*. A) Inmunofluorescencia en células transfectadas con los siRNAs siControl o si4GI-3 usando el anticuerpo frente al extremo C-t de eIF4GI y To-Pro 3 para teñir los núcleos. B) Inmunofluorescencia de las células transfectadas con los siRNAs siControl y si4GII-2 usando el anticuerpo frente a la región C-t de eIF4GII y tiñendo los núcleos con To-Pro 3. C) Doble inmunofluorescencia empleando los anticuerpos frente a la subunidad p110 de eIF3 v frente al extremo C-t de eIF4GI en células transfectadas con los siRNAs siControl o si4GI-3.

fluorescencia. De acuerdo con los resultados anteriores, el siRNA si4GI-3 indujo un descenso significativo de la fluorescencia obtenida con el anticuerpo frente a eIF4GI, en comparación con las células control (Figura 27A). Un incremento del contraste reveló que mientras que en las células control eIF4GI se distribuía de forma difusa por el citoplasma, en las células transfectadas con el siRNA si4GI-3 el factor se concentraba en gránulos citoplasmáticos (Figura 27C). Por otro lado, el siRNA si4GII-2 también produjo un descenso significativo de la fluorescencia asociada a eIF4GII respecto a las células control (Figura 27B). Sin embargo, en este caso no detectamos una distribución anormal de eIF4GII, tal y como ocurría con eIF4GI. Estos datos reflejan la gran eficacia de los siRNAs si4GI-3 y si4GII-2 para interferir el mRNA de eIF4GI y eIF4GII, respectivamente.

Para determinar el posible origen de los gránulos donde se acumulaba eIF4GI en las células transfectadas con el siRNA si4GI-3, se realizó una inmunofluorescencia usando el anticuerpo frente a la región C-t de eIF4GI (Figura 27 C, en verde) y otro frente a la subunidad p110 del eIF3 (Figura 27C, en rojo). De nuevo, en las células control eIF4GI se distribuyó de forma difusa por el citoplasma, mientras que la subunidad p110 del eIF3 dio lugar a un patrón punteado. En cambio, en las células transfectadas con el siRNA si4GI-3 la distribución de eIF4GI se correspondió con la obtenida con el anticuerpo frente a p110 (Figura 27C). Por tanto, estas estructuras donde se acumula eIF4GI en las células transfectadas podrían ser gránulos de estrés, ricos en eIF3 (Kedersha, N. y Anderson, P., 2007) o zonas discretas en la célula donde se produzca la síntesis de proteínas, proceso en el que el eIF3 participa directamente (Hinnebusch, A.G., 2006).

3.1.10. Crecimiento celular y síntesis de proteínas en situaciones de déficit de factores de iniciación de la traducción.

Nuestro siguiente objetivo fue determinar el grado de participación de eIF4GI, eIF4GII y NAT1/DAP5/p97 en la expresión génica en células humanas. Para ello, se transfectaron células HeLa X1/5 con los siRNAs siControl, si4GI-3, si4GII-2, sip97-1 o una mezcla 1:1 del si4GI-3 y el si4GII-2, siguiendo el procedimiento de doble transfección explicado en el apartado anterior. En este experimento se incluyó un nuevo siRNA, descrito previamente, que interfiere eficazmente el mRNA del eIF4E y se denomina si4E (Svitkin, Y.V. y col., 2005). Durante las primeras 24 h se mantuvo la Tet en el medio, pero tras la segunda transfección, el antibiótico se eliminó para inducir la síntesis de Luc (Figura 13). A las 48 h tras el inicio del experimento se observaron las células por microscopía de contraste de fases y se hizo un recuento. Los siRNAs si4GI-3, si4GII-2 y si4E produjeron un descenso aproximado de un 40-60% en el número de células en comparación con la cantidad observada en los pocillos transfectados con el siControl o con el sip97-1 (Figura 28A). La transfección con la mezcla de los siRNAs si4GI-3 y si4GII-2 produjo unos resultados aún más notables, provocando un descenso en el número de células del

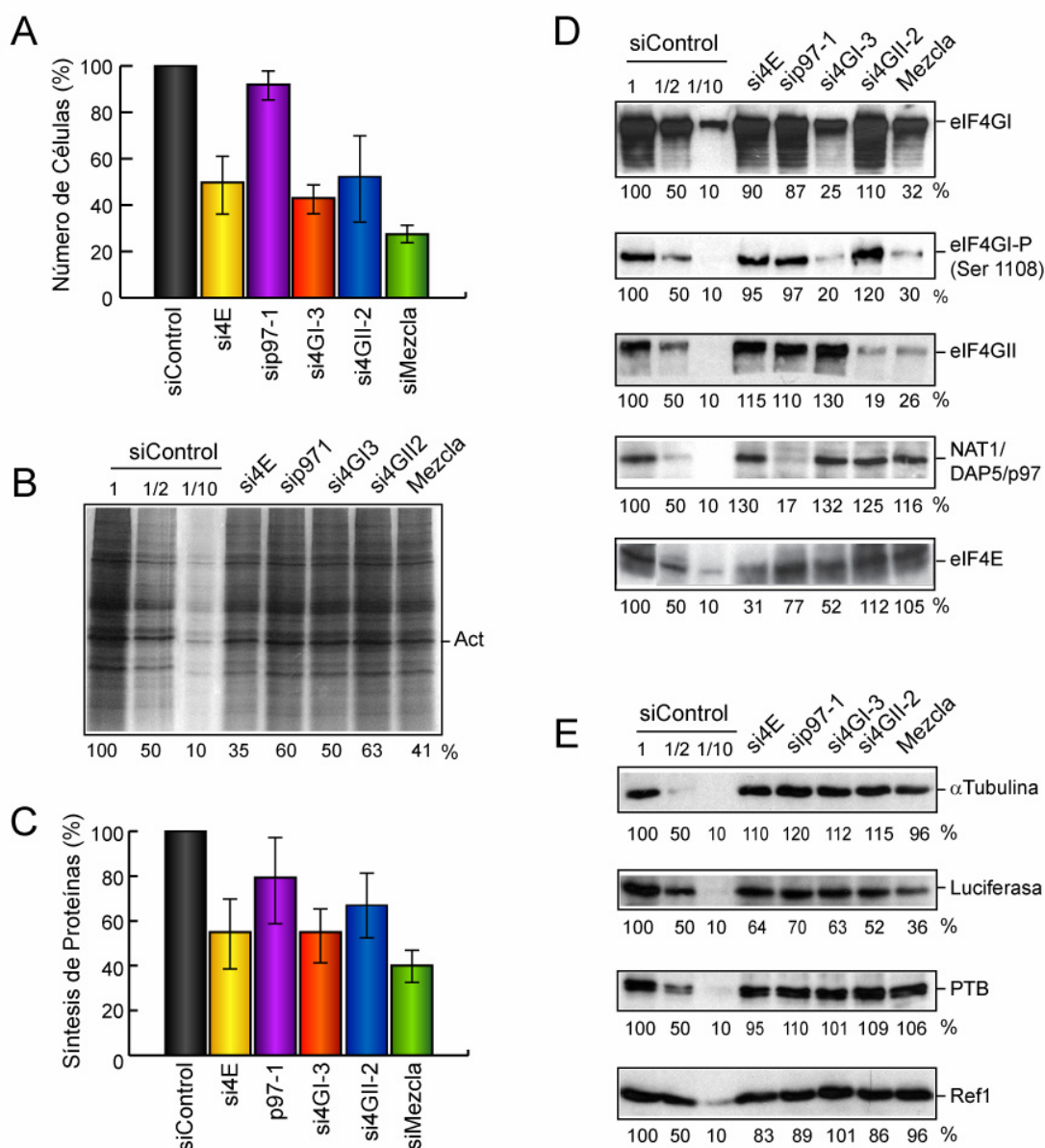


Figura 28. Depleción de eIF4E, eIF4GI, eIF4GII y NAT1/DAP5/p97 en células HeLa X1/5. Efecto en el crecimiento celular y en la síntesis de proteínas. Se transfirieron dos veces (0 y 24 h) células HeLa con los siRNAs siControl, si4E, sip97-1, si4GI-3, si4GII-2 y una mezcla 1:1 del si4GI-3 y si4GII-2. En la segunda transfección, a las 24 hpt, se eliminó la Tet del medio. De la h 47 a 48 se realizó un marcaje radiactivo de proteínas. A) La gráfica muestra la cantidad relativa de células presentes a las 48 h en cada pocillo, visualizadas por microscopía óptica de contraste de fase. Las barras de error representan la D.E. obtenida de 3 experimentos independientes. B) La gráfica muestra la síntesis media de actina en células transfectadas con los distintos siRNAs. Las barras de error representan la D.E. obtenida de 3 experimentos. C) Síntesis de proteínas analizada por fluorografía y autorradiografía. D) *Western blots* realizados con anticuerpos contra los eIFs diana: eIF4GI, eIF4GI fosforilado en la Ser 1108, eIF4GII, NAT1/DAP5/p97 y eIF4E. E) *Western blots* usando anticuerpos frente a α Tubulina, Luc, PTB y Ref 1.

80% respecto a los pocillos de células control (Figura 28A). No obstante, la morfología de estas fue aparentemente normal (Figura 27). Estos resultados sugieren que tanto el eIF4E como eIF4GI y eIF4GII son relevantes en la proliferación celular, posiblemente, por su importancia como reguladores de la síntesis de proteínas.

A las 48 h se recogieron las células y se analizó la síntesis de proteínas presente en 10 μ g de cada extracto. Todos los siRNAs indujeron un descenso parcial en las síntesis de proteínas

respecto de las células transfectadas con el siRNA siControl (Figura 28B y C). El déficit en eIF4E, producido por la acción del si4E, indujo una fuerte inhibición en la síntesis de proteínas (Figura 28B, C y D, línea 4). Este resultado es coherente con la función que desempeña eIF4E en la célula, ya que es el factor que reconoce la estructura *cap* de los mRNAs (Gingras, A.C. y col., 1999). Por otro lado, la depleción de eIF4GI produjo una inhibición de la síntesis de actina próxima al 50%. En cambio, la disminución de su homólogo, eIF4GII, dio lugar una disminución moderada en la traducción (Figura 28B, C y D, línea 6 frente a 7). Estos resultados contrastan con los obtenidos previamente con la electroporación de EMC-2A en células HeLa y BHK y pueden explicarse por el hecho de que la proteasa 2A de PV corta los dos factores liberando la porción C-t, que secuestra los ribosomas mediante su dominio de interacción con eIF3. En cambio, la disminución en la cantidad total de eIF4GI o eIF4GII podría potenciar que su homólogo le sustituyese funcionalmente. Sin embargo, el hecho de que el déficit de eIF4GI o eIF4GII produzca una inhibición de la proliferación celular sugiere que no son completamente sustituibles. En el caso del siRNA sip97-1, el número de células no resultó afectado respecto al control (Figura 28A). Coherentemente, la síntesis de proteínas fue tan sólo moderadamente inhibida, a pesar de que la cantidad del total de NAT1/DAP5/p97 disminuyó en más de un 80% (Figura 28B, C y D). Estos datos sugieren que el papel de NAT1/DAP5/p97 en traducción podría estar restringido a las situaciones de estrés celular y apoptosis (Lewis, S.M. y col., 2007, Nevins, T.A. y col., 2003). Por último, la transfección de la mezcla de siRNAs si4GI-3 y si4GII-2 produjo una disminución significativa de los factores eIF4GI y eIF4GII (Figura 27D, línea 8). La síntesis de proteínas en estas células resultó fuertemente inhibida (~60-70%) (Figura 28B y C, línea 8). Teniendo en cuenta la disminución de la proliferación celular observada (Figura 28A), podemos concluir que la pérdida total de eIF4GI y eIF4GII podría inhabilitar la maquinaria de biosíntesis de proteínas. La acción de todos los siRNAs fue muy específica, de modo que no se vio significativamente alterada la cantidad de ninguna de las proteínas analizadas, salvo de la proteína diana (Figura 28 D y E). No fue este el caso de Luc, cuya expresión había sido inducida a las 24 h por la retirada de la Tet durante la segunda transfección. Todos los siRNAs indujeron una disminución parcial de su cantidad respecto a las células control. En especial, la combinación de los siRNAs si4GI-3 y si4GII-2 indujo una inhibición del 70% en la expresión de Luc (Figura 28E). Estos resultados también contrastan con los obtenidos con el EMC-2A, en los que sólo se requería el corte de eIF4GI para silenciar la expresión de esta proteína (Figura 14 y 17).

En definitiva, el descenso en la disponibilidad de eIF4GI o eIF4GII supone un daño parcial en la síntesis de proteínas y en la división celular. Sin embargo, la ausencia de ambos factores implica una notable disminución en la capacidad de la célula de sintetizar proteínas y, consecuentemente, de activar los programas de división celular.

3.2. ALTERACIÓN DEL *SPLICING* Y DE LA EXPORTACIÓN DE mRNAs DEL NÚCLEO AL CITOPLASMA POR LA PROTEASA 2A DEL PV.

Se ha descrito que la proteasa 2A del PV es capaz de hidrolizar proteínas nucleares implicadas en procesos como la transcripción o en el ensamblaje de las snRNPs U, tales como la proteína de unión a la caja TATA (TBP, TATA-binding protein) o la gemina-3, respectivamente (Almstead, L.L. y Sarnow, P., 2007, Weidman, M.K. y col., 2003). En nuestros experimentos se observa un descenso del 90-95% en la expresión de luciferasa en las células HeLa X1/5 electroporadas con 1µg de EMC-2A (Figura 15A). Lo curioso de este resultado es que en esas condiciones la síntesis de proteínas tan sólo se inhibió parcialmente (Figura 15B). Dado que la cantidad total del mRNA de Luc era igual que la de las células control, se decidió determinar si estos efectos eran debidos a la inhibición de la traducción de este mRNA por el corte de eIF4GI o a daños en pasos previos en la expresión génica, como el transporte de mRNAs del núcleo al citoplasma.

3.2.1. Alteración por 2A^{pro} de la exportación de RNAs del núcleo al citoplasma.

Ciertas proteínas virales como la proteína de la matriz (M) del virus de la estomatitis vesicular (VSV) inhiben el transporte del núcleo al citoplasma de los transcritos procesados (Faria, P.A. y col., 2005, Fontoura, B.M. y col., 2005). Ésta es una excelente herramienta para evitar la inducción de respuestas por parte de la célula hospedadora en las primeras etapas de la replicación viral. Teniendo en cuenta este precedente, decidimos estudiar si 2A^{pro} modificaba este proceso. Para ello, se electroporaron células HeLa X1/5 con tampón de transcripción o con 1 ó 9 µg de EMC-2A. De acuerdo con los experimentos de la sección anterior, la síntesis Luc en las muestras transfectadas con el EMC-2A fue fuertemente inhibida (más de un 90%) respecto del control a las 8 hpe (Figura 29A). Teniendo en cuenta estos datos, se recogieron las células y se separaron las fracciones nucleares (N) de las citoplásmicas (C). El fraccionamiento se realizó correctamente, puesto que la polimerasa de poli-ADP-ribosa (PARP) estaba enriquecida en la fracción nuclear, mientras que la α -Tubulina y el rRNA 18S lo estaban en la fracción citoplásmica (Figura 29B y 30C). Un dato relevante es que no se observa el producto de corte de 80 KDa de PARP, lo que implica que la caspasa-3 no estaba activa y que, por tanto, no se ha inducido una respuesta apoptótica por la expresión de la proteasa viral (Calandria, C. y col., 2004, Goldstaub, D. y col., 2000). Una vez verificada la eficacia del fraccionamiento N/C, se procedió a aislar el RNA presente en cada fracción y a cuantificar por PCR a tiempo real los mRNAs Luc y β -actina. En las fracciones totales no se observaron variaciones en la cantidad de estos mRNAs por la expresión de 2A^{pro} (datos no mostrados). Este resultado confirma que la transcripción no estaba dañada. La distribución C/N del mRNA β -actina no varió respecto al obtenido en las células control, posiblemente debido a que existe una gran población citoplásmica pre-existente (Figura 29C). Sin embargo, la exportación del mRNA de Luc sufrió

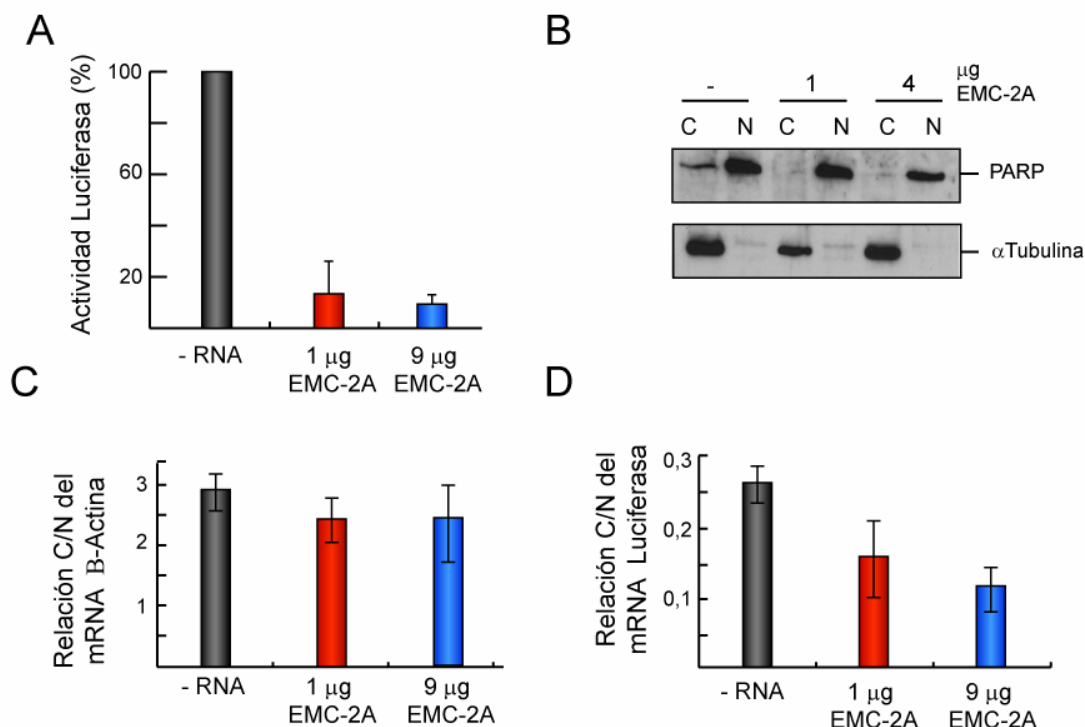


Figura 29. Efecto de 2A^{pro} en la exportación del mRNA de β-actina y luciferasa del núcleo al citoplasma. Se electroporaron células HeLa X1/5 con 1 ó 9 μg de EMC-2A o con tampón de transcripción como control. A) A las 8 hpe las células se recogieron en PBS y se analizó la actividad Luc presente en cada extracto. En paralelo, se fraccionaron las células y se aislaron los núcleos y citoplasmas. B) Como control del fraccionamiento se analizó por *western blotting* la distribución subcelular de PARP y de α-Tubulina. Después, se aisló el RNA presente en las fracciones total, nuclear y citoplasmática y se analizó por RT-PCR a tiempo real con sondas frente a β-actina (C) y Luc (D). En los paneles C y D se muestra la relación C/N de cada mRNA.

una inhibición parcial (40-60%) (Figura 29D). Dado que el mRNA de Luc producido en las células HeLa X1/5 no está sometido a *splicing*, se puede concluir que la proteasa 2A del PV es capaz de afectar el transporte de ciertos RNAs del núcleo al citoplasma. Sin embargo, la disminución observada en la cantidad citoplásmica del mRNA de Luc (40-60%) no es suficiente para explicar la fuerte inhibición de la expresión de Luc (90-95%).

Para determinar si el efecto de 2A^{pro} en la exportación de mRNAs del núcleo al citoplasma pudiera tener un papel fisiológico en la infección viral, se analizó la distribución de mRNAs que codifican para proteínas implicadas en la respuesta inmune, tales como *cox-1*, *cox-2*, *IL-2* e *IL-6*; o en la proliferación celular e inducción de apoptosis, analizando los mRNAs de *p53* y *c-myc*. Además, se cuantificó también en cada fracción el snRNA U2 y el rRNA 18S. Como se observa en la Figura 30A, se detectaron diferencias notables en la cantidad de los distintos RNAs, siendo el más numeroso el rRNA 18S, seguido por el mRNA de β-actina y el snRNA U2. Nótese que no se pudo cuantificar el mRNA de *IL-2*, posiblemente debido a que no es una IL ubicua y se expresa principalmente en células del sistema inmune. La cantidad en la fracción total del rRNA 18S y de los mRNAs de β-actina, *cox-1* y *cox-2* fue muy similar independientemente de la expresión de la 2A^{pro}. Sin embargo, la cantidad del snRNA U2 y de

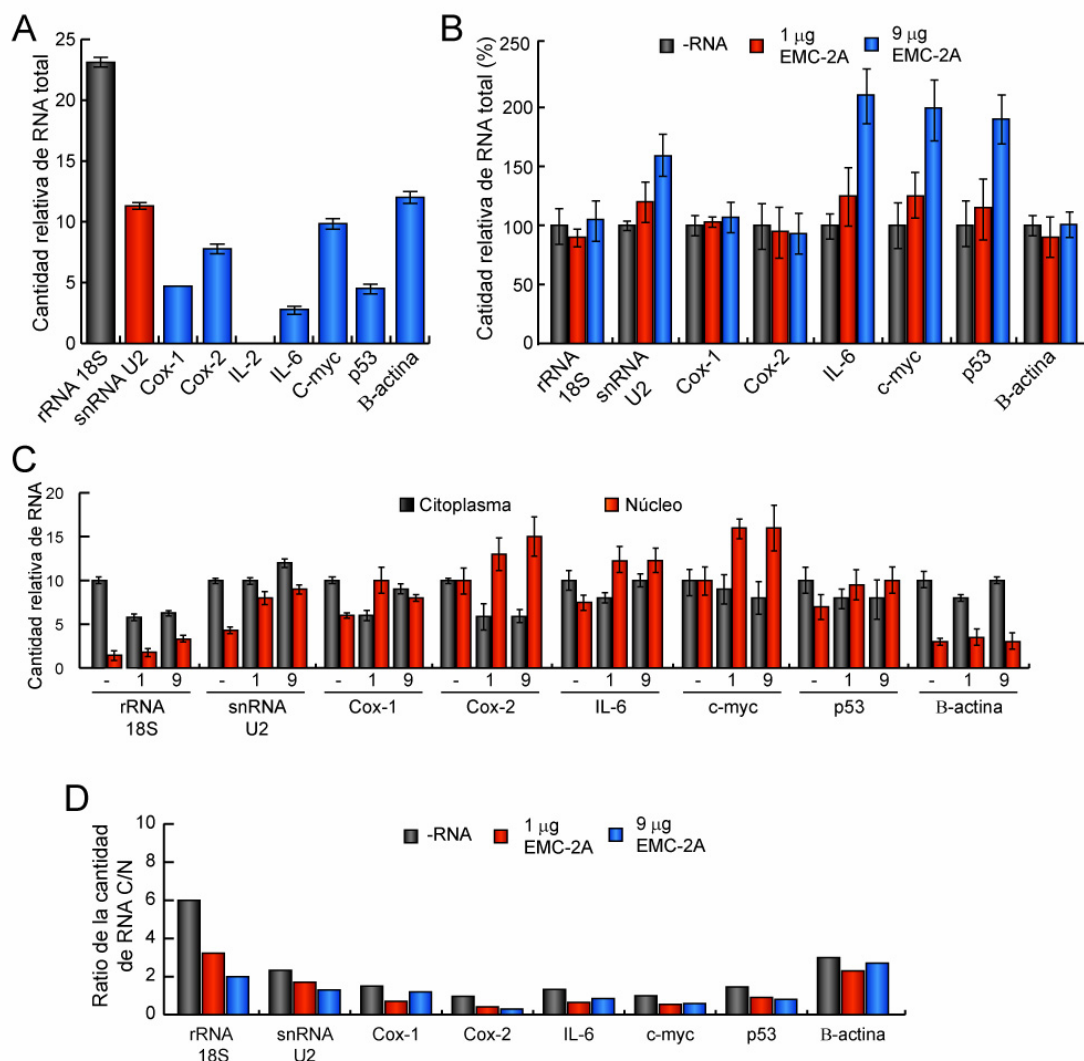


Figura 30. Efecto de 2A^{pro} en la exportación de RNAs del núcleo al citoplasma. Los aislados de RNA total obtenidos en la figura 29 se sometieron a nuevos análisis por RT-PCR a tiempo real usando sondas Taqman frente al rRNA 18S, el snRNA U2 o los mRNAs *cox-1*, *cox-2*, *IL-2*, *IL-6*, *p53*, *c-myc* y β -actina. A) Comparación de las cantidades relativas de cada RNA en las células control. B) Cantidad relativa de cada RNA en relación a la dosis de EMC-2A usada en la electroporación. C) Relación entre la cantidad de RNA citoplásmica y nuclear; ratio C/N. Las barras de error representan la D.E.

los mRNAs *IL-6*, *c-myc* y *p53* aumentó de forma dependiente de la dosis de EMC-2A empleada (Figura 30B). Este dato sugiere que la expresión de 2A^{pro} induce una respuesta celular.

En relación con la distribución de cada RNA en las fracciones N y C, 2A^{pro} indujo cambios significativos en la localización de casi todos los RNAs. Así, su número disminuyó o se mantuvo en la fracción C y se incrementó en la fracción N (Figura 30C y D). La única excepción fue el mRNA de β -actina, que mantuvo su distribución normal. La inhibición de transporte de RNAs desde el núcleo se produjo en las células transfectadas con 1 µg de EMC-2A y, en ciertos casos, se potenció notablemente con 9 µg de EMC-2A. Cabe destacar que los RNAs rRNA 18S y snRNA U2 también sufrieron cambios en su distribución en las células transfectadas con EMC-2A (Figura 30C y D).

En conclusión, 2A^{pro} alteró, en mayor o menor medida, el transporte del núcleo al citoplasma de los RNAs rRNA18S y snRNA U2 y de todos los mRNAs testados salvo el de β -actina.

3.2.2. Localización subcelular de los mRNAs en células transfectadas con e EMC-2A.

Para determinar si los efectos observados en la exportación de mRNAs por la acción de 2A^{pro} podían generalizarse, buscamos un método que nos permitiera observar *in situ* la localización de la población de mRNAs en cada célula. Para este fin, se electroporaron células HeLa con 1 ó 9 μ g de EMC-2A, usando tampón de transcripción como control. A las 16, 24 y 48 hpe se fijaron las células y se realizó una hibridación *in situ* con un oligodesoxitimina (OligodT), compuesto por 50Ts, fusionado a fluorescencia (OligodT-F). Dado que el oligodT-F hibrida con las colas de poli(A) de los mRNAs, esta estrategia nos permite visualizar la distribución de los mRNAs por microscopía confocal. En paralelo, teñimos las células fijadas con el compuesto To-Pro 3, para poder situar el núcleo y comprobar el estado de la cromatina. La distribución subcelular de los mRNAs en las células control se caracterizó por ser difusa en el citoplasma y punteada, pero intensa, en el núcleo (Figura 31). Este patrón nuclear punteado probablemente se corresponda con los sitios donde está activa la transcripción de mRNAs. Cuando transfectamos con 1 μ g de EMC-2A se produjo desde las 16 hpe un incremento sutil de la señal nuclear del OligodT-F respecto a la citoplásmica (Figura 31A). En cambio, las células electroporadas con 9 μ g de EMC-2A, mostraron cambios claros en el patrón de la fluorescencia. Las alteraciones ordenadas según el momento de su aparición fueron: i) Una clara disminución de la señal procedente del oligodT-F en el citoplasma. ii) La fluorescencia nuclear pasó de ser punteada a difusa, con una clara exclusión de los nucleolos. iii) Aparecieron en el citoplasma gránulos enriquecidos en mRNAs, posiblemente gránulos de estrés debidos a la inhibición de la síntesis de proteínas. iv) Posteriormente, se detectó una pérdida total de la población de mRNAs en el citoplasma a excepción de la presente en los gránulos citoplásmicos, mientras la fluorescencia nuclear permaneció intacta (Figura 31A y B). v) A tiempos más tardíos (48 h), se observó la pérdida de los nucleolos y una clara condensación de la cromatina, sugiriendo que se había inducido una respuesta apoptótica (Figura 31B).

Por tanto, se puede concluir que la proteasa 2A del PV es capaz de inhibir, de forma directa o indirecta, la exportación de los mRNAs del núcleo al citoplasma. La alteración del tráfico de los RNAs podría impedir o, al menos, mitigar la respuesta celular a la replicación del PV.

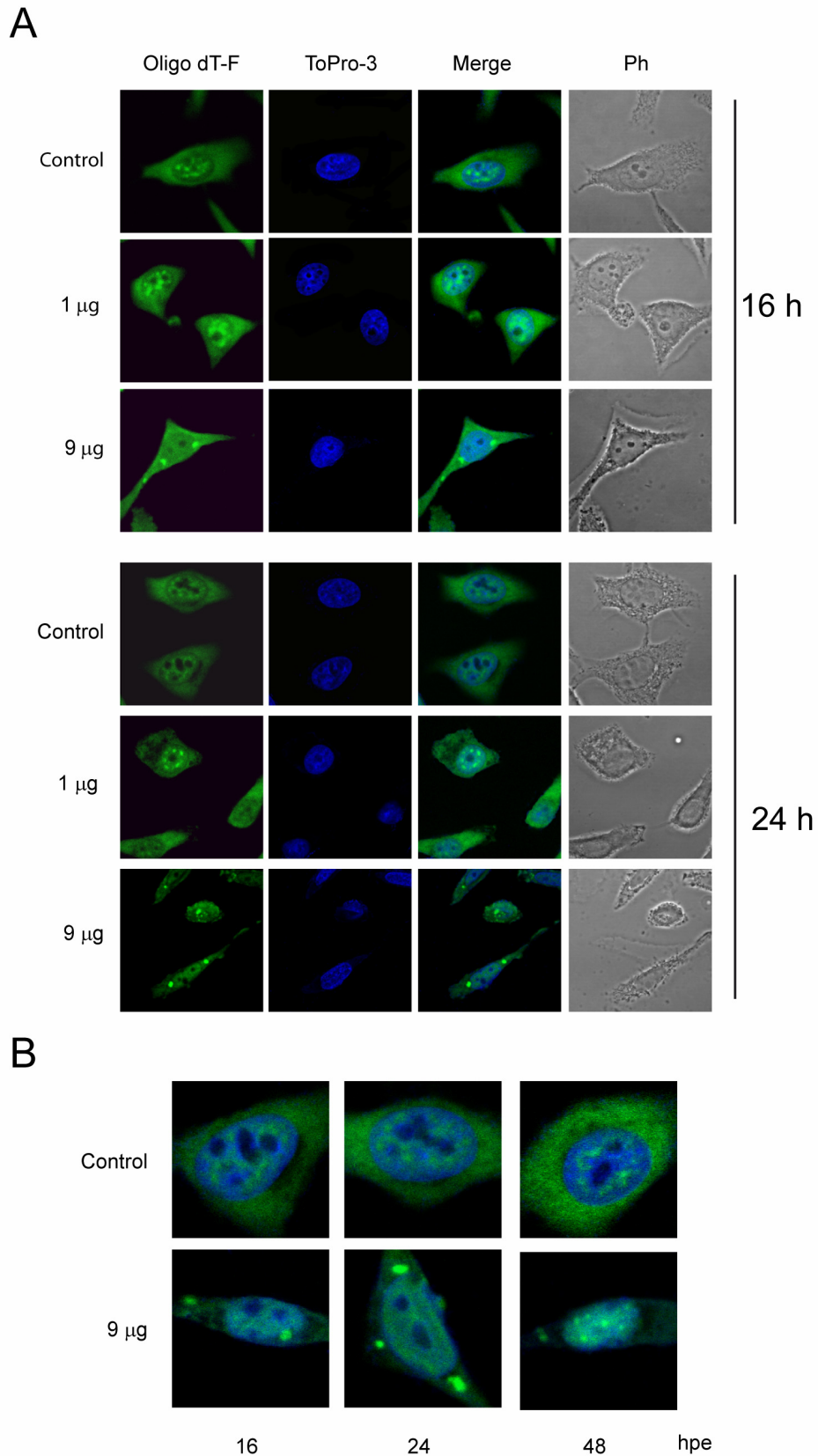


Figura 31 Efecto de 2A^{Pro} en la distribución subcelular de los mRNAs. Se electroporaron células HeLa con 1 ó 9 μ g de EMC-2A o tampón de transcripción como control. A las 16, 24 y 48 hpe se fijaron las células y se realizó una hibridación *in situ* con una sonda fluorescente de poliTs OligodT-F, tiñendo los núcleos posteriormente con ToPro-3. Las células se visualizaron con un microscopio *Radiance* 2000, utilizando el objetivo 63x/1.4 *oil Plan-Apochromat* (Zeiss) (A y B).

3.2.3. Localización subcelular de los productos de corte de eIF4GI y eIF4GII en células que expresan 2A^{pro}.

Se ha descrito que eIF4G forma parte del complejo de iniciación nuclear junto con CBP20 y CBP80, cuyo ensamblaje podría inhibirse por el corte de eIF4GI mediado por HIV-2 PR (Lejeune, F. y col., 2004). Dado que la inhibición de la exportación de los RNAs suele conllevar la acumulación en el núcleo de las proteínas implicadas en su exportación, analizamos la localización subcelular de cada fragmento de proteólisis de eIF4GI y eIF4GII generados por 2A^{pro}. Para ello, se electroporaron células HeLa con 1 ó 9 μg de EMC-2A o tampón de transcripción como control. A las 8 hpe las células se fijaron y se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpos frente a los extremos N-t o C-t de cada forma de eIF4G.

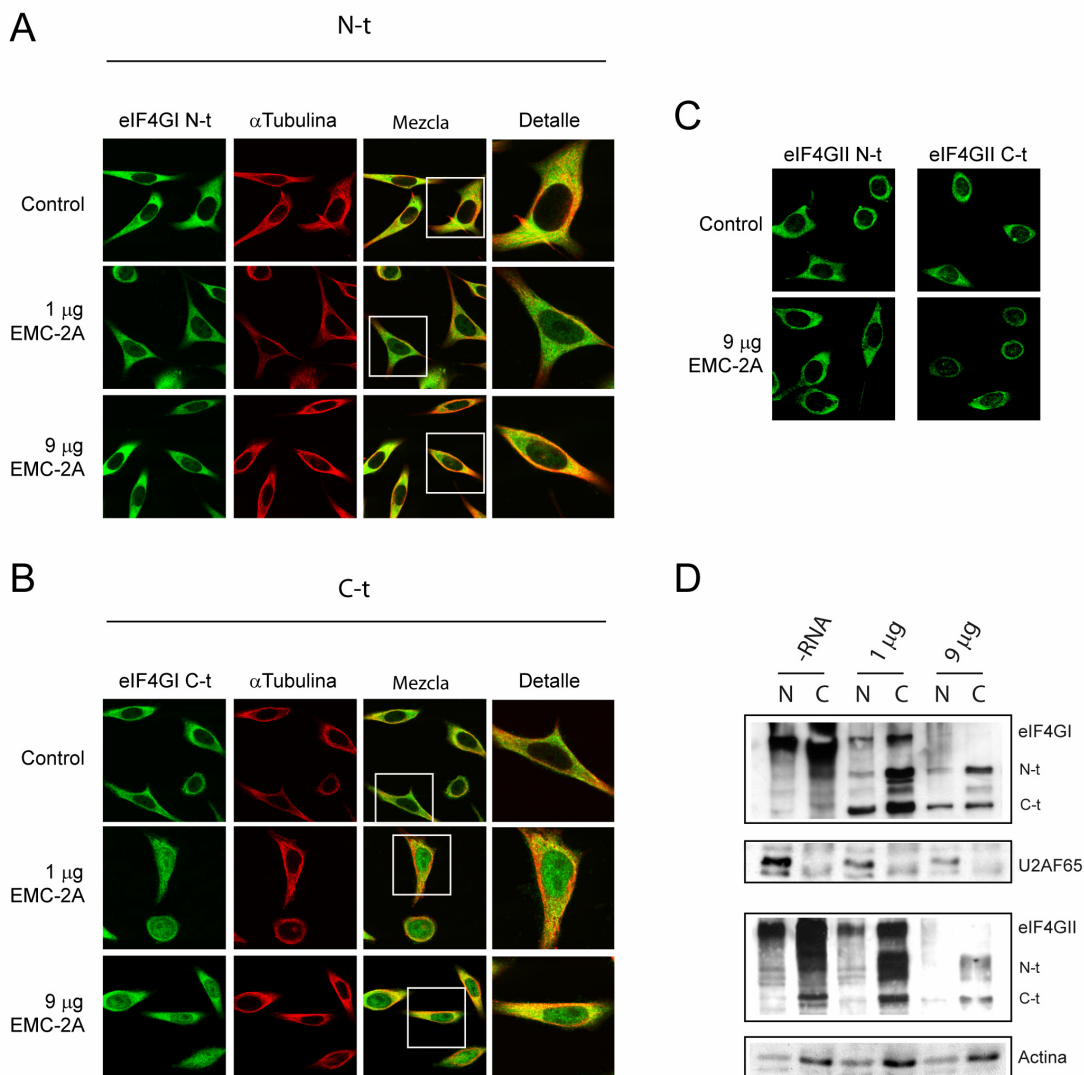


Figura 32 Distribución subcelular de los productos de corte de eIF4GI y eIF4GII en las células transfectadas con EMC-2A. Se electroporaron células HeLa con 1 ó 9 μg de EMC-2A o tampón de transcripción como control. A las 8 hpe se fijaron las células y se realizó una inmunofluorescencia usando los anticuerpos frente los extremos N-t (A) o C-t (B) de eIF4GI y frente a la α -tubulina. C) Inmunofluorescencia con los anticuerpos frente a los extremos N-t o C-terminal del eIF4GII. D) En paralelo, las células electroporadas se fraccionaron aislando los núcleos y citoplasmas y se detectaron los factores eIF4GI (panel 1), U2AF65 (panel 2), eIF4GIII (panel 3) y α -tubulina (panel 4) por *western blot*.

La distribución de eIF4GI y eIF4GII fue mayoritariamente citoplásmica en las células control (Figura 32 A, B y C). Se ha descrito que la expresión de los productos de corte N-t y C-t del eIF4G fusionados a GFP, no cambian su distribución en la célula respecto del factor completo (Coldwell, M.J. y col., 2004). Este resultado se reprodujo con el fragmento N-t de eIF4GI generado por 2A^{pro} del PV, dado que su localización fue principalmente citoplásmica (Figura 32A). Sin embargo, el producto C-t se localizó por igual en el citoplasma y en el núcleo, pero con una clara exclusión de los nucleolos (Figura 32B). Por el contrario, la distribución de los productos N-t y C-t de eIF4GII en las células transfectadas con el EMC-2A continuó siendo citoplásmica (Figura 32C). De modo que la localización subcelular de los productos de corte de eIF4GI y eIF4GII producidos por 2A^{pro} del PV es diferente.

Para estudiar en mayor profundidad este resultado se realizó un fraccionamiento N/C de las células electroporadas. Como control de localización nuclear se detectó por *western blot* el factor de *splicing* U2AF65 y la proteína de citoesqueleto α -tubulina como control citoplásmico (Figura 32D). Dado que la distribución de estas proteínas era la correcta, podemos afirmar que el fraccionamiento fue realizado adecuadamente. Los factores eIF4GI y eIF4GII mostraron una localización mayoritariamente citoplásmica, aunque se pudo detectar una pequeña población nuclear (Figura 32D) (McKendrick, L. y col., 2001). De acuerdo con estos resultados, los productos de corte N-t de eIF4GI y los N-t y C-t de eIF4GII estaban enriquecidos en las fracciones citoplásmicas (Figura 32D). En cambio, la cantidad del producto C-t de eIF4GI se incrementó en la fracción nuclear respecto al producto N-t (Figura 32D). De hecho, la relación C/N de este fragmento aumentó de 2 a 5 comparado con las células control (Figura 32D).

La fluorescencia asociada con el fragmento C-t de eIF4GI en el núcleo dio lugar a un patrón punteado que abarcó toda la superficie nuclear salvo los nucleolos. Para determinar si dicha distribución era propia de los *speckles*, estructuras nucleares donde tiene lugar el *splicing*, se electroporaron células HeLa con 1 ó 9 μ g de EMC-2A o tampón de transcripción como control y a las 8 hpe se realizó una doble inmunofluorescencia frente a los productos N-t o C-t de eIF4GI y frente al factor de *splicing* U2AF65. De nuevo, el patrón de eIF4GI en las células control fue citoplasmático, al igual que el producto N-t generado por 2A^{pro} (Figura 33A). En cambio, la cantidad del producto C-t de eIF4GI aumentó en el núcleo de las células transfectadas con el EMC-2A, dando un patrón punteado que coincidió parcialmente con la localización de la proteína U2AF65 (Figura 33A y B). De acuerdo con el experimento anterior, ninguno de los productos de corte de eIF4GII producidos por 2A^{pro} cambió su localización respecto a la proteína intacta presente en las células control (Figura 33C).

En conclusión, el producto C-t de eIF4GI producido por 2A^{pro} se acumula en el núcleo, siendo su localización similar a la de U2AF65, factor presente en los *speckles*.

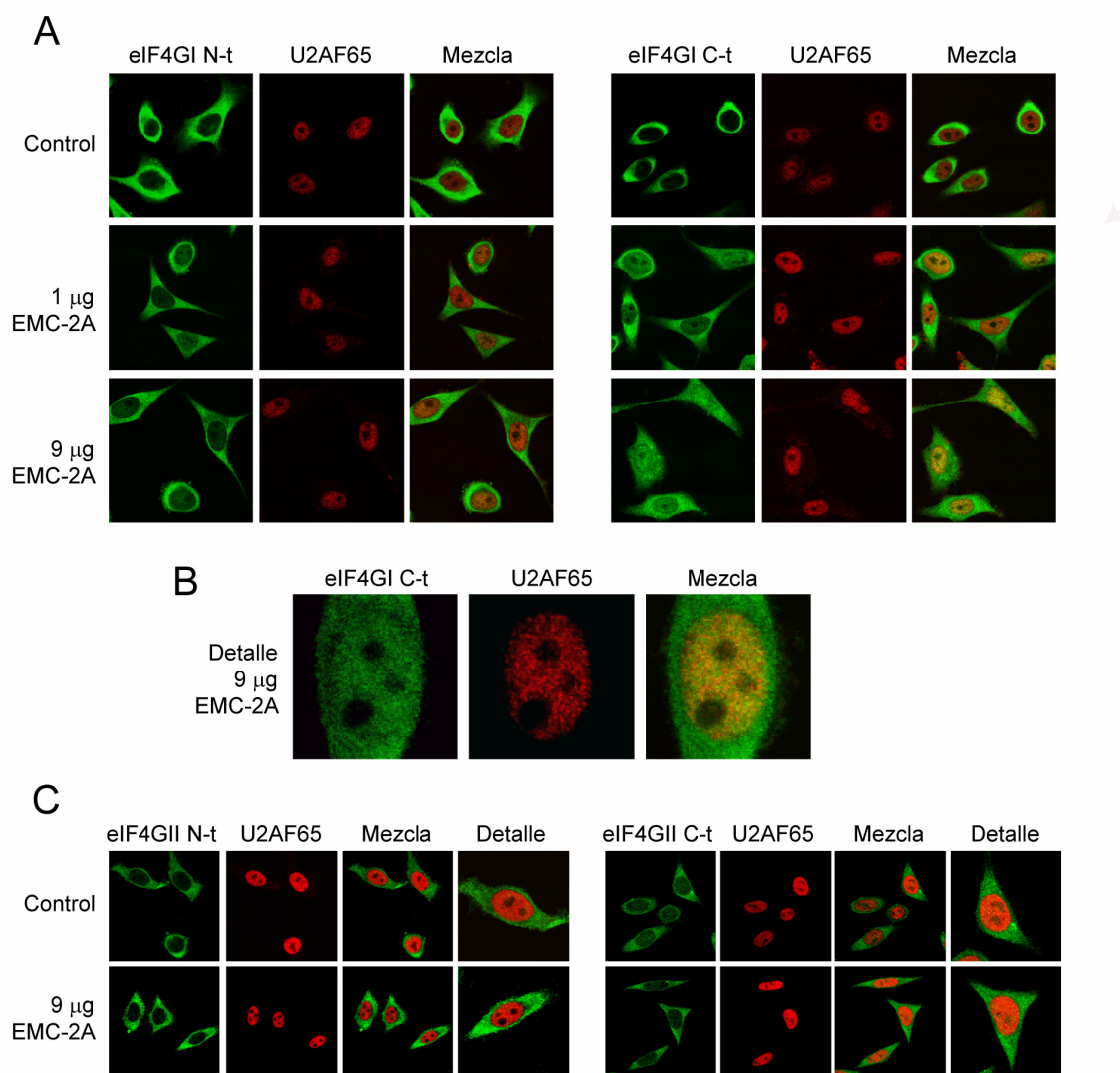


Figura 33. Distribución de los productos de corte de eIF4GI y eIF4GII respecto a la proteína U2AF65. Se electroporaron células HeLa con 1 ó 9 μg de EMC-2A o tampón de transcripción. A las 8 hpe se fijaron las células y se realizó una inmunofluorescencia usando los anticuerpos frente los extremos N-t o C-t de eIF4GI y frente a la U2AF65. B) Detalle de las células electroporadas con 9 μg de EMC-2A.

3.2.4. Distribución de los mRNAs en células depletadas de eIF4GI y eIF4GII.

Los resultados obtenidos hasta este momento indican que un factor de iniciación de la traducción como eIF4G podría contribuir en la exportación de RNAs del núcleo al citoplasma. Con el fin de determinar si eIF4G participa activamente en este proceso decidimos disminuir su disponibilidad en la célula y visualizar la distribución de los mRNAs en esas condiciones. Así, se transfectaron células HeLa con los siRNAs siControl, si4GI-3, si4GII-2 o una mezcla 1:1 del si4GI-3 y el si4GII-2 en el momento de inicio del experimento y 24 h después. 72 h tras la primera transfección las células se fijaron y se realizó una hibridación *in situ* con la sonda fluorescente OligodT-F. Posteriormente, se localizó los eIFs interferidos usando los anticuerpos frente al fragmento C-t del eIF4GI (Figura 34A), frente al C-t del eIF4GII (Figura 34B) o una mezcla de ambos (Figura 34C). Además, situamos los núcleos tiñéndolos con ToPro-3.

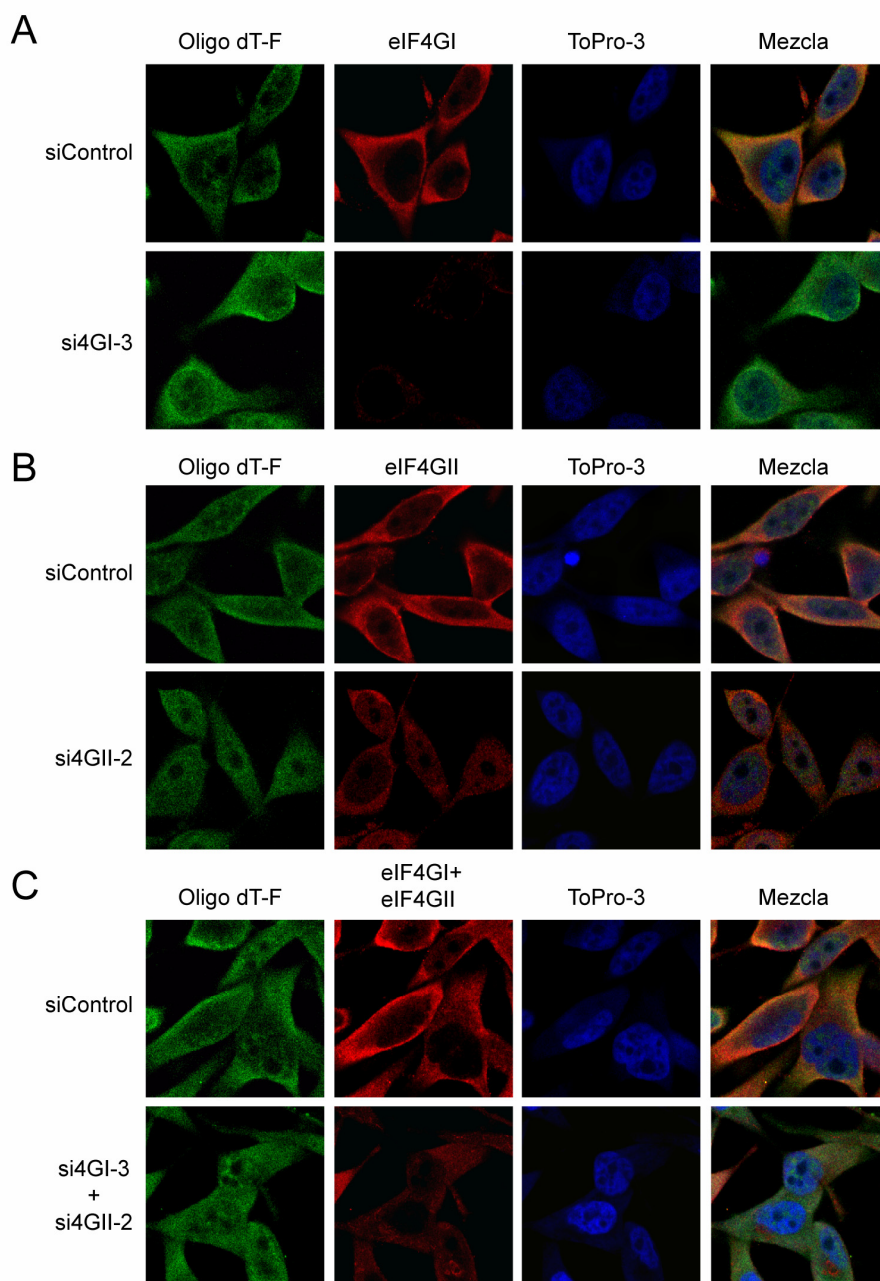


Figura 34. Efecto de la depleción de eIF4GI y eIF4GII en la distribución subcelular de los mRNAs. Se transfirieron dos veces (0 y 24 h) células HeLa con los siRNAs siControl, si4GI-3, si4GII-2 y una mezcla 1:1 del si4GI-3 y si4GII-2. A las 72 hpt se fijaron las células y se realizó una hibridación *in situ* con una sonda fluorescente de poliTs OligodT-F, tiñendo los núcleos posteriormente con ToPro-3. Por último, se realizó una inmunofluorescencia empleando los anticuerpos frente el extremo C-t de eIF4GI (A), de eIF4GII (B) o una mezcla de ambos (C) en las células transfectadas con los siRNAs si4GI-3 (A), si4GII-2 (B) o con la mezcla si4GI-3 y si4GII-2 (C), respectivamente. Las células se visualizaron con un microscopio *Radiance 2000*, utilizando el objetivo 63x/1.4 *oil Plan-Apochromat* (Zeiss).

La expresión de $2A^{pro}$ indujo una clara acumulación de los mRNAs en el núcleo (Figura 31B). En cambio, en una situación de déficit de eIF4GI, eIF4GII o de ambos no se produjo ningún cambio en la localización o en la cuantía de los mRNAs respecto a las células control (Figura 34A, B y C). Nótese que el grado de depleción de eIF4GII o eIF4GI y eIF4GII detectado por inmunofluorescencia confocal en las células transfectadas con el si4GII-2 o la mezcla si4GI-3 y si4GII-2 fue significativamente menor a la observada por *western blot* (Figura

34B y C). Este resultado se reprodujo en varias ocasiones y sugiere que el anticuerpo frente al extremo C-t de eIF4GII da lugar a una cantidad de fluorescencia basal elevada.

Nuestros resultados indican que aunque eIF4GI y eIF4GII participen en la exportación de mRNAs del núcleo al citoplasma, su papel no es esencial en este proceso. Por tanto, o bien la 2A^{pro} hidroliza algún sustrato no identificado hasta la fecha que sea requerido para las rutas de transporte de mRNAs, o bien el producto C-t de eIF4GI generado podría actuar como un inhibidor competitivo al secuestrar proteínas tales como CBP20 y CBP80 (Lejeune, F. y col., 2004).

3.2.5. Efecto de 2A^{pro} en el *splicing* de mRNAs.

La exportación de mRNAs del núcleo al citoplasma es un proceso acoplado al *splicing* de los pre-mRNAs, de modo que los mRNAs inmaduros no son transportados eficazmente al citoplasma (Cullen, B.R., 2000;2003). Para determinar si 2A^{pro} impide el procesamiento de los pre-mRNAs, electroporamos células HeLa con 1 ó 9 µg de EMC-2A y las transfectamos 4 h después con un plásmido que codifica parte del gen del receptor Fas, proteína implicada en apoptosis. Este plásmido se transcribe en el núcleo, debido a que posee un promotor de citomegalovirus, y da lugar a un pre-mRNA compuesto por los exones 5, 6 y 7 del gen Fas, separados por sus correspondientes intrones. Los mRNAs maduros dan lugar a una proteína Fas truncada que no induce ni inhibe la apoptosis (Forch, P. y col., 2000). A las 16 hpe se recogieron las células y se aislaron las fracciones total, nuclear y citoplásmica. Los productos del RNA de Fas presente en cada fracción se analizaron por RT-PCR. En la fracción total de las células control se observaron 3 productos, correspondientes al pre-mRNA, seguido por el mRNA procesado que contiene los exones 5-6-7 y el producto más pequeño, compuesto por los exones 5-7 (Figura 35B). El producto 5-6-7, que es mayoritario en las células control, codifica para la proteína Fas-truncada que contiene un dominio transmembrana que le permite asociarse con la membrana plasmática. La proteína Fas completa con este dominio puede transmitir señales pro-apoptóticas por la unión con su ligando. En cambio, el producto 5-7 produce una forma de Fas-truncada que no puede asociarse con la membrana. La forma soluble de la proteína Fas es capaz de competir por el ligando, siendo por tanto una proteína antiapoptótica (Figura 35A) (Izquierdo, J.M. y col., 2005).

Coherentemente, el pre-mRNA se detectó sólo en las fracciones total y nuclear, quedando excluido de la fracción citoplásmica. Este resultado indica que el fraccionamiento fue realizado correctamente (Figura 35B y C). Sin embargo, en las células control los productos 5-6-7 y 5-7 se observaron en las tres fracciones, sugiriendo que eran exportados del núcleo al citoplasma (Figura 35B y C). Mientras que en las células control el producto 5-6-7 fue el más abundante, en las células electroporadas con 1 µg de EMC-2A la forma predominante fue la 5-7 (Figura 35B). Este efecto, conocido como *skipping*, supone un cambio en la producción de la proteína Fas pro-

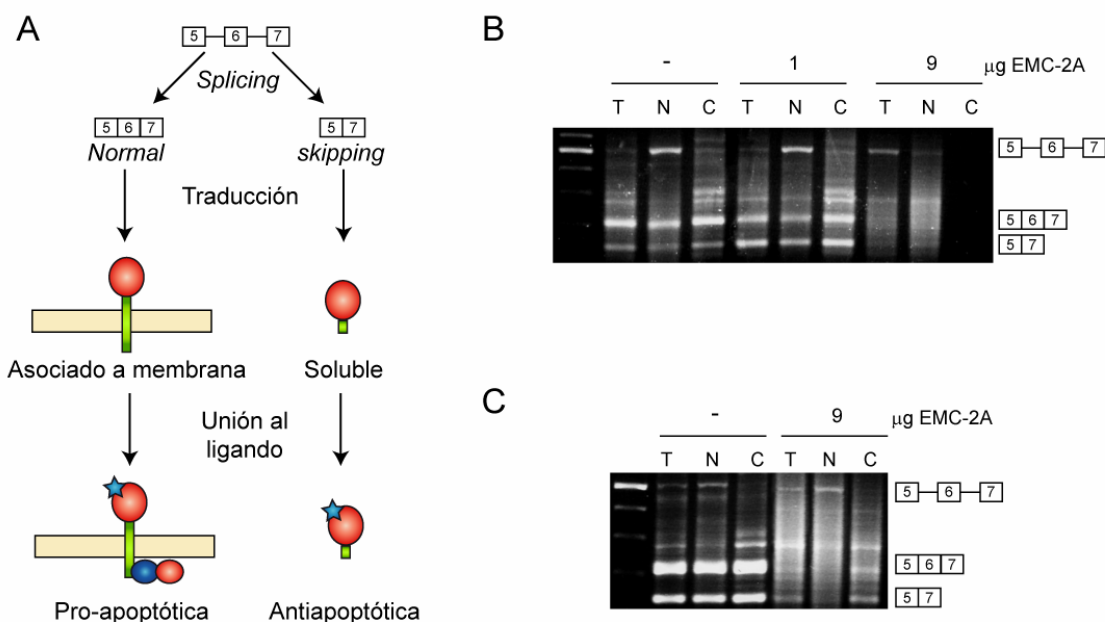


Figura 35. Impacto de 2A^{pro} en el *Splicing* alternativo del mRNA de Fas. A) El mRNA de Fas es procesado alternativamente de modo que la inclusión o la exclusión del exón 6 define si la proteína resultante es capaz o no de asociarse con la membrana plasmática. La presencia o ausencia de la región transmembrana define si Fas actuará como un factor pro-apoptótico o antiapoptótico. B) Se electroporaron células HeLa con 1 ó 9 µg de EMC-2A. A las 4 hpe se transfectó el plásmido pCMV-Fas ΔI6. A las 16 hpt se recogieron las células en solución de fraccionamiento y se aislaron las fracciones total, nuclear y citoplásmica. Se aisló el RNA de cada fracción y se realizó una RT-PCR con oligonucleótidos frente a la secuencia de Fas. Visualización de los productos amplificados por la RT-PCR mediante electroforesis en gel de agarosa con urea. C) Repetición del experimento usando 9 µg de EMC-2A y tampón de transcripción como control. Las muestras se procesaron como se ha descrito previamente (B).

apoptótica a la Fas antiapoptótica e indica que la maquinaria de *splicing* ha sido dañada. Nótese que en estas células la exportación de los RNAs del núcleo al citoplasma no se inhibió (Figura 35B). En cambio, en las células electroporadas con 9 µg de EMC-2A, sólo se pudo detectar el pre-mRNA, enriquecido en la fracción nuclear. Por tanto, no se generaron apenas los productos 5-6-7 y 5-7 (Figura 35B y C). Este resultado indica que la expresión de 2A^{pro} inhibe directa o indirectamente el *splicing*. Además, el daño en el procesamiento de los pre-mRNAs de Fas es mayor conforme se aumenta la dosis de EMC-2A.

Para determinar si la proteasa había cortado algún componente de la maquinaria de *splicing* se realizaron *western blots* frente a diversas proteínas seleccionadas por su relevancia en el *splicing* y por su susceptibilidad al corte mediado por la caspasa-3, que comparte numerosos sustratos con las proteasas 2A y 3C del PV (Belov, G.A. y col., 2004, Prevot, D. y col., 2003). En las células transfectadas con 1 µg de EMC-2A se hidrolizó eIF4GI, pero no eIF4GII. Como era esperable, en las células transfectadas con 9 µg de este mRNA se cortaron las dos formas de eIF4G (Figura 36A). Sin embargo, 2A^{pro} no proteolizó las proteínas CBP80, U2AF65, U2AF35, SPF45, Ref-1 (Aly), SFPQ (Figura 36B), PTB y CBP20 (datos no mostrados). Teniendo en cuenta que PTB, SFP45 y U2AF65 son conocidos sustratos de la caspasa-3 podemos concluir que la inhibición del *splicing* del pre-mRNA de Fas no es debido a una respuesta apoptótica inducida por la expresión de la proteasa viral.

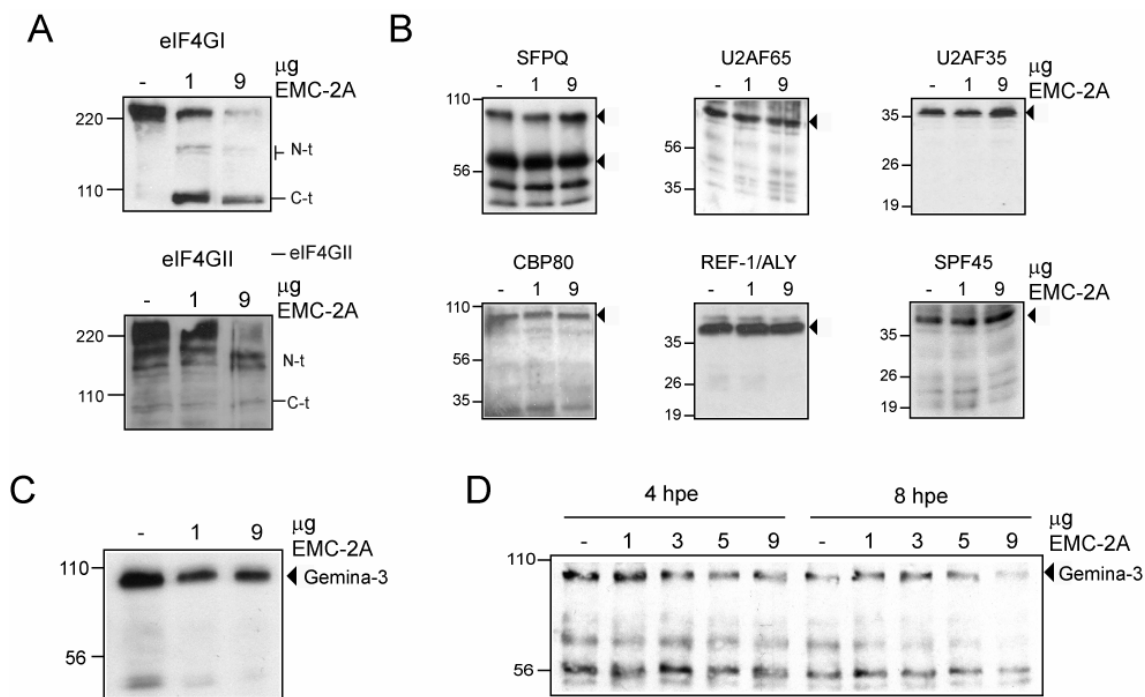


Figura 36. Impacto de 2A^{pro} en factores celulares asociados con el *splicing* en células HeLa. Los extractos procedentes de las fracciones totales obtenidos en la figura 25 fueron analizados por *Western blots*: A) eIF4GI y eIF4GII; B) SFPQ, U2AF65, U2AF35, CBP80, REF-1/ALY y SPF45 y C) gemina-3. D) Se electroporaron células HeLa con 1, 3, 5 ó 9 μg de EMC-2A o tampón de transcripción como control. A las 4 y 8 hpe se recogieron las células y se analizaron por *western blot* usando el anticuerpo frente a la gemina-3.

La gemina-3 es una proteína implicada en el ensamblaje de las snRNPs U y se ha descrito que es hidrolizada por 2A^{pro} en las células infectadas con el PV (Almstead, L.L. y Sarnow, P., 2007). Por ello, se analizó su integridad en las células transfectadas con el EMC-2A. Como se observa en la Figura 36 C y D, la gemina-3 es degradada de forma dependiente de dosis de EMC-2A empleada en las células transfectadas. La disminución de la cantidad de esta proteína fue de un 40-50% en las células electroporadas con 1 μg de EMC-2A y del 50-80% cuando se empleó 9 μg (Figura 36C y D). A pesar de que se ha descrito que 2A^{pro} corta la gemina-3 dando lugar a un producto de ~50 KDa nosotros no pudimos detectarlo con nuestro anticuerpo (Figura 36C y D). No obstante, la degradación de la gemina-3 se observó usando extractos procedentes de distintos experimentos (datos no mostrados), lo cual indica que es un evento generalizado en las células que expresan 2A^{pro}. Por tanto, el corte de la gemina-3 podría ser el responsable de la inhibición del *splicing*.

En conclusión, la 2A^{pro} inhibe el *splicing* del pre-mRNA de Fas de forma dependiente de dosis. De entre todas las proteínas examinadas sólo la gemina-3, eIF4GI y eIF4GII resultaron afectadas por la proteasa viral.

3.2.6. *Splicing in vitro* en presencia de proteasas virales.

Para determinar cual era la etapa del *splicing* sobre la que $2A^{pro}$ estaba actuando, se pre-trataron extractos nucleares de células HeLa en presencia o ausencia de ATP, con $5 \mu\text{g}$ de la proteína recombinante MBP- $2A^{pro}$ o con 20 ng de HIV-1 PR. 15 minutos después se programó el extracto con 40.000 cpm del RNA Minx, marcado radiactivamente, manteniendo la reacción 30 min . Este RNA de adenovirus está compuesto por dos exones (A y B) y un intrón. En ausencia de ATP sólo se detectó el pre-mRNA en los extractos (Figura 37, líneas 1 y 7). Sin embargo, cuando se añadió ATP a la reacción se observó la aparición del producto AB con una relación 1:1 respecto al pre-mRNA (Figura 37, líneas 2 y 3). HIV-1 PR indujo una inhibición total del *splicing*, de modo que sólo se pudo detectar el pre-mRNA (Figura 37, línea 5). Sin embargo, MBP- $2A^{pro}$ indujo un patrón completamente diferente, ya que se acumuló el exón A libre y el exón B unido al intrón (Figura 37, línea 4). Este dato indica que mientras HIV-1 PR inhabilita completamente el *splicing*, MBP- $2A^{pro}$ inhibe específicamente el paso de liberación del intrón por su extremo $3'$. Por tanto, aunque ambas proteasa cortan el eIF4GI no inhiben el *splicing* de la misma forma. Esto sugiere que la $2A^{pro}$ no bloquea el *splicing* por la hidrólisis de eIF4GI, sino por la de otro factor implicado en la liberación del intrón. Por otro lado, la posible participación de la gemina-3 en esta inhibición será discutida en detalle.

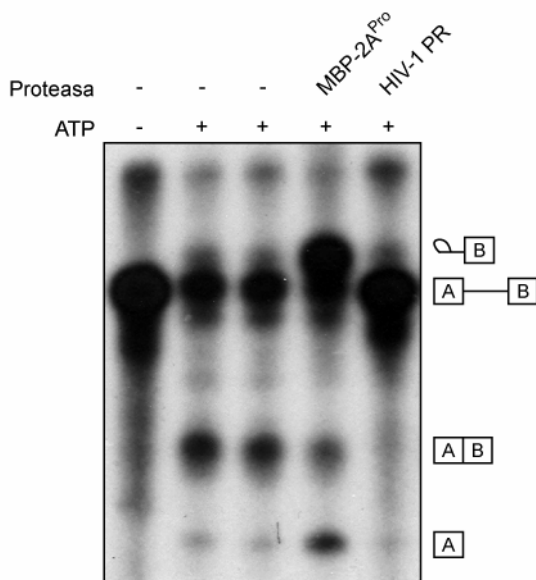


Figura 37. Efecto de MBP- $2A^{pro}$ y HIV-1 PR en el *splicing* de Minx en extractos nucleares de células HeLa. Los extractos nucleares de células HeLa se pre-incubaron con $5 \mu\text{g}$ de MBP- $2A^{pro}$ o 20 ng de HIV-1 PR. 15 min después se cargaron con 40.000 cpm del pre-mRNA Minx en presencia o ausencia de ATP. Se añadieron 20 ng de HIV-1 PR o $5 \mu\text{g}$ de MBP- $2A^{pro}$ y se detuvo la reacción 30 min más tarde. Las muestras se analizaron por autorradiografía. Los recuadros A y B representan los exones del pre-mRNA, mientras que la línea que las separa representa el intrón. El bucle representa el lazo.

3.3. HIDRÓLISIS DE PABP POR LA PROTEASA DE HIV. EFECTOS EN LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.

3.3.1. PABP es hidrolizada en células infectadas con HIV-1.

Como se describe en el apartado 3.1. de Resultados, la hidrólisis de eIF4GI en si misma es insuficiente para inhibir la síntesis de proteínas. Sin embargo, en nuestro laboratorio se había descrito que el silenciamiento de la traducción en células infectadas con HIV-1 correlaciona con la hidrólisis de eIF4GI, inducida por HIV-1 PR (Ventoso, I. y col., 2001). Por tanto, para inhibir la síntesis de proteínas HIV-1 PR debe proteolizar otros sustratos de la maquinaria de traducción con una cinética similar a la de eIF4GI. En este sentido, se ha descrito que la proteasa 3C^{pro} del PV induce la inhibición de la traducción mediante el corte proteolítico de PABP (Kuyumcu-Martinez, N.M. y col., 2004). Teniendo en cuenta esta posibilidad, decidimos determinar el estado de PABP en las células infectadas con HIV-1. Para ello, se infectaron células MT-2 con 1 ufp/célula del HIV-1. A los 3 días post infección se observó el estado de eIF4GI, eIF4GII y PABP por *western blot*. La infección por el retrovirus indujo una reducción significativa de PABP, con la aparición de un polipéptido cercano a los 53 KDa (Figura 38A). El anticuerpo frente a PABP reconoció un producto inespecífico (indicado con +) que estaba presente en las células control e infectadas en la misma cantidad (Figura 38A). Como era de esperar, la infección indujo una hidrólisis parcial de eIF4GI, mientras eIF4GII y eIF4A permanecieron intactos (Figura 38 A y B). Como control de que las células habían sido correctamente infectadas por el HIV-1 se realizó un *western blot* frente a la proteína de la cápsida (p24 o CA). En la Figura 38C se puede observar tanto la poliproteína Gag (p55), así como sus productos MA-CA y CA, generados por la actividad proteolítica de HIV-1 PR.

En conclusión, en las células infectadas con HIV-1 se produce tanto el corte de eIF4GI como el de PABP. Ambos podrían estar implicados en la regulación de la expresión génica celular y viral.

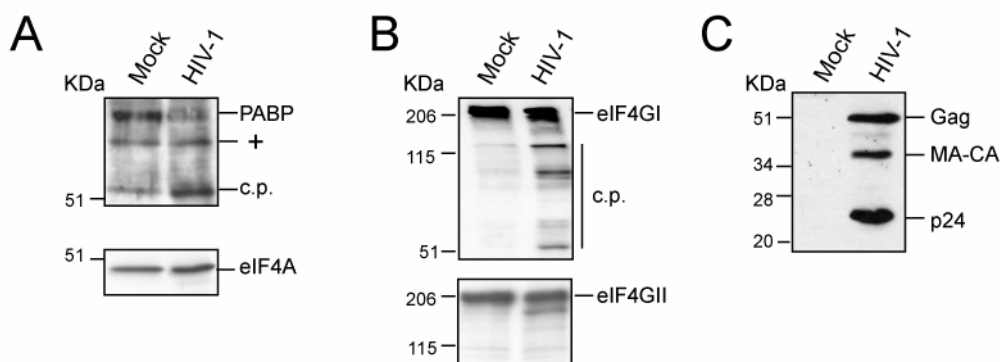


Figura 38. Corte de PABP en células MT-2 infectadas con HIV-1. Las células MT-2 se infectaron con el HIV-1 con una multiplicidad de 1. A los 3 dpi se analizó el estado de los eIFs por *Western blots* empleando anticuerpos específicos: A) PABP (panel superior) y eIF4A (panel inferior); B) eIF4GI (panel superior) y eIF4GII (panel inferior) y C) p24 (CA) de HIV-1. c.p., producto de corte. +, producto inespecífico detectado por el anticuerpo frente a PABP.

3.3.2. El corte de PABP es inducido por la proteasa de HIV-1 y de otros retrovirus.

Para determinar si HIV-1 PR era el agente causal de la proteólisis de PABP, se infectaron células COS-7 con el virus recombinante vvT7 y se transfectaron inmediatamente después con distintos plásmidos pTM1 que codificaban las proteasas de los retrovirus HIV-1 y -2, MoMLV, MMTV, HTLV-I o SIV; además de la proteasa 2A del PV. A las 16 hpt se recogieron las células y se sometieron a análisis. La expresión de las proteasas del HIV-1 y -2, así como la proteasa del MMTV indujeron un sustancial descenso en la cantidad total de PABP, tal y como sucedió con 2A^{pro} (Figura 39A). No obstante, no se detectaron productos de corte en ningún caso, posiblemente, debido a su inestabilidad en las células no infectadas. La adición de saquinavir (SQ) evitó la degradación de PABP, sugiriendo que la hidrólisis de PABP por HIV-1 y HIV-2 PR es directa o indirectamente debida a la actividad proteasa de estas proteínas virales (Figura 39A). Sin embargo, la expresión de las proteasas del MoMLV, HTLV-I o SIV no produjo ningún descenso en la cantidad de PABP, indicando que la hidrólisis de este sustrato no es extrapolable a otras proteasas de retrovirus. En este sentido, eIF4GII es hidrolizado solamente por las proteasas del MoMLV, MMTV, HTLV-I o SIV, mientras que eIF4GI es una diana común para todas las proteasas de retrovirus (Figura 39B y C) (Alvarez, E. y col., 2003). Tan sólo MMTV PR fue capaz de inducir la hidrólisis de los 3 sustratos simultáneamente (Figura 39).

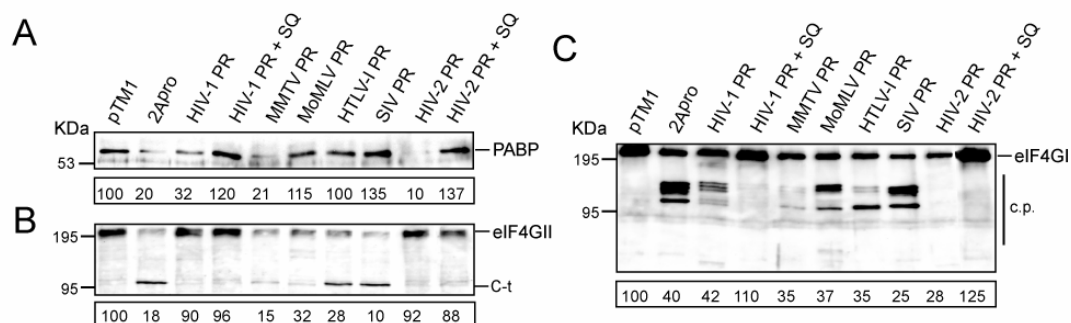


Figura 39. Corte de PABP, eIF4GI y eIF4GII en células COS-7 que expresan proteasas de retrovirus. Se transfectaron células COS-7 con los plásmidos pTM1, pTM1-HIV-1 PR, pTM1-HIV-2 PR, pTM1-MMTV PR, pTM1-MoMLV PR, pTM1-HTLV PR, pTM1-SIV PR y pTM1-2A de forma acoplada a la infección con el vvT7. En los pocillos indicados se añadió SQ 2 μ M. A las 16 hpt se analizó el estado de PABP (A), eIF4GI (B) y eIF4GII (C) por *western blot*.

3.3.3. La hidrólisis de PABP por HIV-1 y -2 PR ocurre simultáneamente a la de eIF4GI *in vitro*.

En células infectadas con HIV-1, la inhibición de la síntesis de proteínas ocurre de forma paralela a la hidrólisis de eIF4GI (Ventoso, I. y col., 2001). Sin embargo, nuestros experimentos previos indicaban que el corte de eIF4GI en solitario es insuficiente para impedir la iniciación de la traducción. Por ello, intentamos determinar si la cinética del procesamiento proteolítico de PABP era simultánea a la de eIF4GI. Se incubaron extractos S₁₀ de células HeLa con las

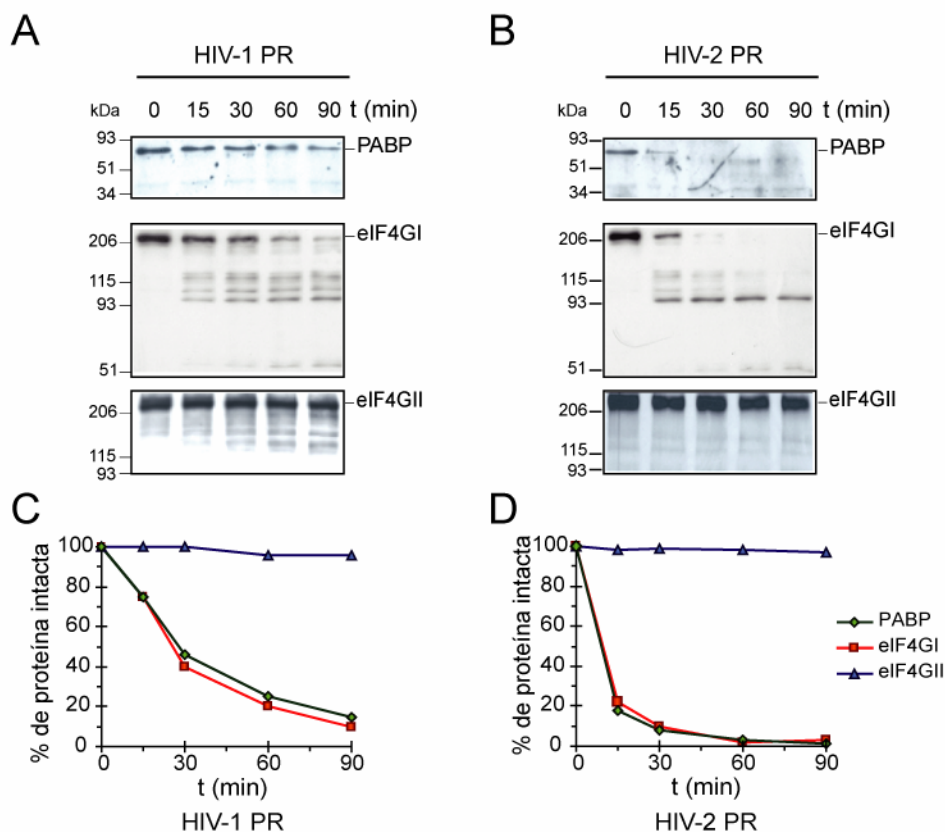


Figura 40. Estudio de las cinéticas de corte de PABP, eIF4GI y eIF4GII por las proteínas HIV-1 PR y HIV-2 PR purificadas. Se incubaron 3 ng/ μ l de las proteasas de HIV-1 (A) y HIV-2 (B) purificadas con 50 μ g de fracciones S₁₀ de extractos de células HeLa. Las reacciones controles o con cada proteasa fueron detenidas a los 0, 30, 60 y 90 min. Los extractos fueron procesados por *western blotting* usando anticuerpos contra eIF4GI, eIF4GII y PABP. Las bandas correspondientes a las proteínas intactas fueron densitometradas y los datos obtenidos se muestran en los paneles C y D.

proteasas recombinantes del HIV-1 y -2, deteniendo las distintas reacciones a los tiempos indicados en la Figura 40. El análisis de los extractos por *western blot* reveló que la hidrólisis de PABP ocurre con una cinética similar a la proteólisis de eIF4GI, tanto con la proteasa del HIV-1 como con la del HIV-2 (Figura 40). En cambio, eIF4GII permaneció intacto a lo largo de toda la reacción (Figura 40).

En definitiva, la inhibición de la síntesis de proteínas inducida por el HIV-1 en ciertas líneas celulares podría ser debido a la hidrólisis de eIF4GI y PABP.

3.3.4. Las proteasas de HIV-1 y -2 hidrolizan de forma directa PABP. Caracterización de los sitios de procesamiento.

Para determinar si el corte de PABP era producido por la actividad directa de las proteasas del HIV-1 y -2 o por la activación de una proteasa celular, se incubó durante 1 h la proteína recombinante GST-PABP1 con las proteasas purificadas del HIV-1 y -2 o MoMLV en un tampón específico, descrito en detalle en los Materiales y Métodos. Como control, se añadió SQ 2 μ M o ritonavir (RTV) 20 μ M para inhibir la actividad de las proteasas del HIV o MoMLV respectivamente. Las muestras fueron procesadas por SDS-PAGE y teñidas con azul de

coomassie. La tinción reveló numerosos productos de corte de GST-PABP1 en presencia de las proteasas del HIV-1 y -2 y un descenso de la cantidad de proteína intacta. En cambio, MoMLV PR no produjo ninguno de estos efectos (Figura 41A). La adición de SQ evitó la proteólisis de GST-PABP1 por la acción de las proteasas de HIV-1 y -2, demostrando que la hidrólisis de la proteína era debida a la actividad directa de estas proteasas (Figura 41A).

Para identificar los sitios de corte concretos de HIV-1 y -2 PR en GST-PABP1, los polipéptidos detectados se secuenciaron mediante el método de degradación de Edman. La secuenciación del extremo N-t de los productos de 27 y 20 KDa dio lugar a los aas FERHED, que se corresponden con una hidrólisis entre los aas 237/238 de PABP1 (Figura 41B). El producto de 18 KDa dio lugar a la secuencia STQRVA que es coherente con la hidrólisis de PABP1 entre los aas 477/478. Además, se detectó un producto adicional con HIV-2 PR de aproximadamente 8 KDa, cuya secuencia N-t se correspondía con una proteólisis entre los aas 410-411 de PABP1 (Figura 41B). La secuenciación de los productos de 72 y 52 KDa coincidió con los 6 primeros aas de GST (Figura 41A, asteriscos).

Estos resultados indican que tanto HIV-1 PR como HIV-2 PR proteolizan PABP1 en posiciones similares. No obstante, HIV-2 PR realiza un corte adicional, situado en las

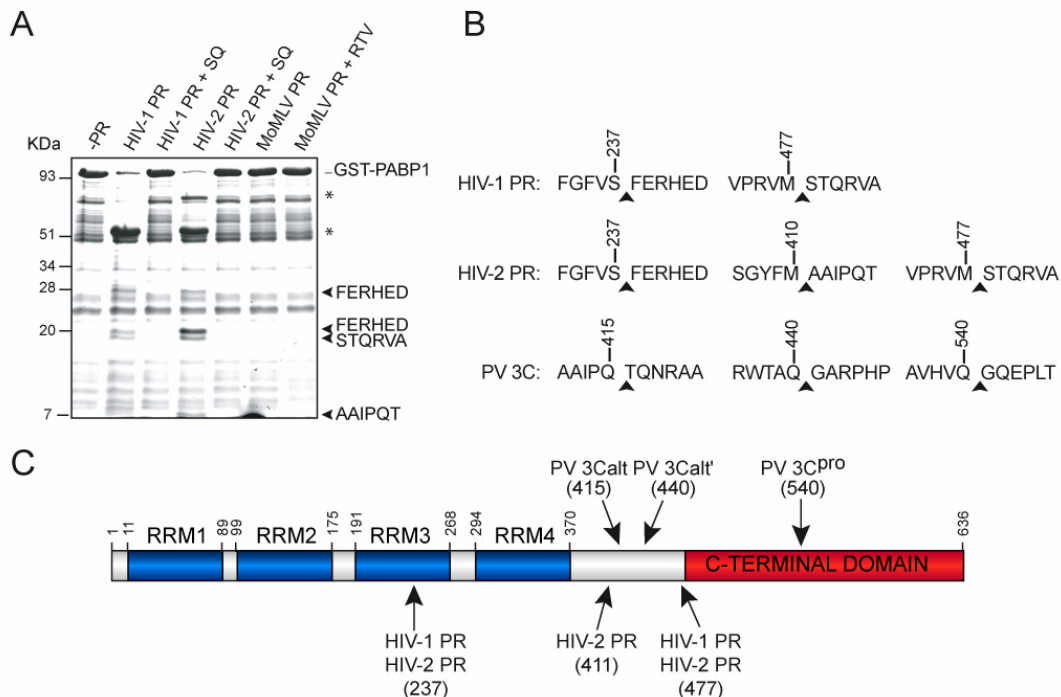


Figura 41. Identificación de los sitios de corte de HIV-1 y HIV-2 PRs en PABP. A) Se incubó durante 1 h la proteína recombinante GST-PABP1 (5µg) con 100 ng de las proteínas recombinantes HIV-1 PR y HIV-2 PR o MoMLV PR en un volumen final de 20 µl y en presencia o ausencia de SQ 2 µM o RTV 20 µM. Los productos de corte fueron separados en un gel de acrilamida del 17% y teñidos mediante incubación con el colorante azul de coomassie. Los péptidos secuenciados por la técnica de degradación de Edman están indicados con puntas de flechas. Las bandas correspondientes a la región N-t de GST se indican con asteriscos. B) Secuencia de aminoácidos que rodean a los sitios de corte de las proteasas de HIV-1 y 2. La localización del corte se indica con puntas de flecha. C) Diagrama de PABP1 indicando los dominios funcionales descritos. Los lugares donde se hallan los sitios de proteólisis de las proteasas de poliovirus, calcivirus y de las proteasas de HIV-1 y 2 se indican con flechas.

posiciones 410/411 (Figura 41C). El hecho de que los sitios de corte se conserven de una a otra proteasa sugiere que PABP1 es un sustrato genuino para las proteasas del HIV-1 y -2.

3.3.5. Efecto de HIV-1 PR y MBP-2A^{pro} en la traducción de mRNAs exógenos en extractos de células HeLa.

Según los resultados anteriores, las proteasas de retrovirus pueden modificar de dos formas diferentes la maquinaria de traducción: i) hidrolizando eIF4GI y PABP o ii) inactivando eIF4GI y eIF4GII. Dado este curioso resultado, decidimos analizar las consecuencias de cada combinación de cortes sobre la síntesis de proteínas en sistemas *in vitro*. Para ello empleamos las proteínas purificadas HIV-1 PR o MBP-2A^{pro}, ya que la primera induce la hidrólisis de eIF4GI y PABP y la segunda la de eIF4GI y eIF4GII. Así, nuestro siguiente objetivo fue determinar el efecto de estas dos proteasas en la traducción de los mRNAs de Luc (+/-) y (+/+) en sistemas libres de células (Figura 18A). Se seleccionaron los lisados S₁₀ de células HeLa por el hecho de que son capaces de soportar un potente sinergismo en traducción entre el *cap* y la cola de poli(A) de los mRNAs (Kuyumcu-Martinez, N.M. y col., 2004). Teniendo en cuenta el ratio de traducción de los mRNAs de Luc (+/-), (+/+), (-/-) y (-/+) en estos extractos, calculamos que el sinergismo que se producía entre las dos estructuras era de ~5 veces (dato no mostrado).

Una vez validados los extractos, se cargaron con 50 ng de los mRNAs (+/-) y (+/+) y se añadieron HIV-1 PR o MBP-2A^{pro} 8 min después de iniciar la reacción (tiempo estimado para la síntesis de una molécula de Luc), permitiendo que los mRNAs exógenos se asocien con la maquinaria de traducción. Este protocolo mimetiza en mayor medida las condiciones fisiológicas, ya que una gran población de mRNAs está asociada a los ribosomas previamente a la infección viral. Por tanto, estos mRNAs deben ser extraídos de la maquinaria de síntesis de proteínas para que los mRNAs virales se apropien de ella. Los extractos se recogieron 1 y 3 h después y se analizó la actividad Luc y el estado de los eIFs.

Tanto HIV-1 PR como MBP-2A^{pro} produjeron una potente inhibición de la traducción de los mRNAs de Luc (+/-) y (+/+) (Figura 42A y B). No obstante, la síntesis de Luc a partir del mRNA (+/+) fue inhibida en mayor medida que a partir del (+/-) con las dos proteasas (Figura 42A, B y C). De hecho, la cantidad neta de actividad Luc en presencia de las proteasas fue similar independientemente del mRNA utilizado (Figura 42A y B). Este resultado sugiere, que la contribución del *cap* y de la cola de poli(A) en traducción es anulada por la acción de HIV-1 PR y MBP-2A^{pro}. Los efectos sobre la síntesis de Luc en los extractos tratados con HIV-1 PR se previnieron con la adición de SQ (Figura 42). Curiosamente, en mezclas de traducción realizadas de la misma manera pero empleando RRL, la traducción de los mRNAs de Luc (+/-) y (+/+) se inhibió en la misma medida, independientemente de la presencia o ausencia de la cola

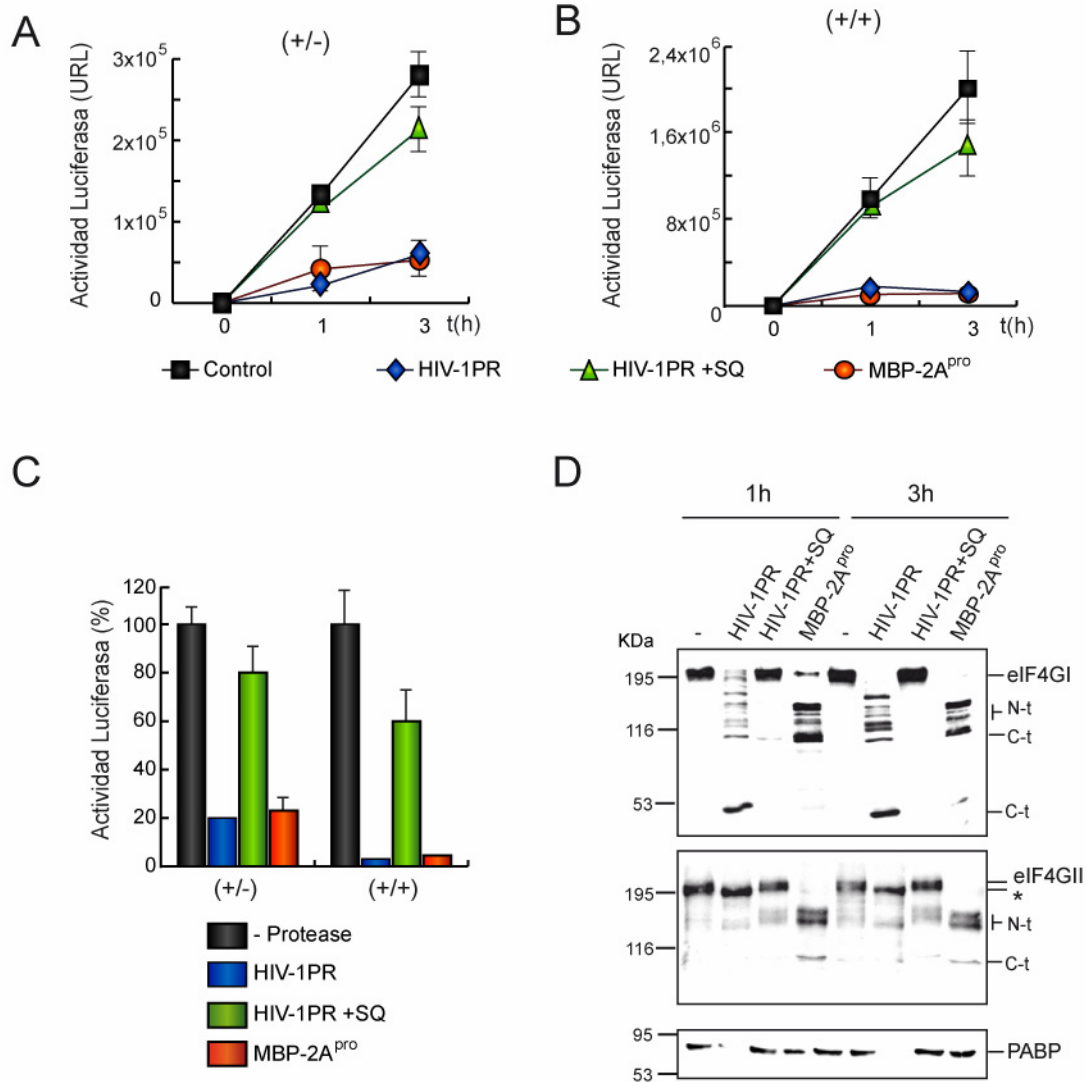


Figura 42. Efectos de HIV-1 PR y MBP-2A^{pro} en traducción en extractos de células HeLa. Los extractos S₁₀ de células HeLa fueron programados con 50 ng de los mRNAs de Luc (+/-) y (+/+). Después de 8 min se añadieron 20 ng de HIV-1 PR (en presencia y ausencia de SQ 2μM) o 5 μg de MBP-2A^{pro}. Los extractos fueron analizados 1 y 3 h después de iniciar la reacción de traducción mediante medida de la actividad Luc obtenida a partir de los mRNAs (+/-) (A) o (+/+) (B). Las barras de error representa la D.E. de tres mediciones. C) La actividad Luc relativa a las 3 h, obtenida de tres experimentos independientes, se muestra en la gráfica, indicando la D.E. relativa a cada punto. D) Además, se analizó por *western blotting* el estado de eIF4GI (panel superior), eIF4GII (panel intermedio) y PABP (panel inferior) en los extractos 1 y 3 horas después del inicio de la reacción. *, eIF4GII en extractos tratados con HIV-1 PR.

de poli(A) (datos no mostrados). Este dato se explica con el hecho de que estos extractos no producen el sinergismo *cap*-poli(A) (Michel, Y.M. y col., 2000).

El análisis por *western blot* de los extractos tratados con HIV-1 PR reveló que eIF4GI y PABP estaban completamente hidrolizados, mientras que eIF4GII permanecía prácticamente intacto (Figura 42D). No obstante, se observó un leve incremento de su movilidad electroforética (indicado con un asterisco) (Perales, C. y col., 2003, Perales, C.B., 2002). Dicho efecto debe ser consecuencia de un corte en el extremo N-t de eIF4GII, ya que el doble tratamiento de extractos de células HeLa con HIV-1 PR y MBP-2A^{pro} induce un ligero aumento en la movilidad electroforética del polipéptido N-t mientras que el C-t no muestra cambios

(datos no mostrados). Dada la disposición de los dominios funcionales en eIF4GII, esta hidrólisis no debería producir ninguna consecuencia en traducción (Perales, C. y col., 2003, Perales, C.B., 2002). En contraste, la proteasa MBP-2A produjo un corte total de eIF4GI y eIF4GII según el patrón descrito para 2A^{pro}, dejando PABP intacta (Figura 42D).

Por tanto, el corte de eIF4GI y eIF4GII inducido por MBP-2A^{pro} inhibe en la misma magnitud la traducción de los mRNAs de Luc (+/-) y (+/+) que el corte de eIF4GI y PABP mediado por HIV-1 PR. Ambas combinaciones bloquean la traducción dependiente del *cap* y de la cola de poli(A).

3.3.6. Efecto de HIV-1 PR y MBP-2A^{pro} en la traducción de mRNAs exógenos y endógenos en extractos de células Krebs-2.

Para determinar el efecto de las proteasas virales en la síntesis de proteínas bajo condiciones de competición por la maquinaria de traducción, empleamos extractos de células Krebs-2 no tratados con nucleasa. Se prepararon las mezclas de reacción con los mRNAs de Luc (+/-) y (+/+) y se añadieron las proteasas HIV-1 PR y MBP-2A^{pro} 8 min después. Las muestras se recogieron 1 y 3 h más tarde, tras un marcaje radiactivo de proteínas de 1 h. En estos extractos el sinergismo *cap*/poli(A) fue de ~4 veces (datos no mostrados). La traducción de ambos mRNAs fue fuertemente inhibida por HIV-1 PR pero no por MBP-2A^{pro}, que indujo una inhibición parcial (Figura 43A y B). Otra diferencia fue que HIV-1 PR bloqueó en mayor medida la traducción del mRNA de Luc (+/+) que la del (+/-), mientras que la inhibición inducida por MBP-2A^{pro} para los dos mRNAs fue de la misma magnitud (Figura 43B). Coherente con estos datos, la traducción endógena fue totalmente inhibida por HIV-1 PR, mientras que MBP-2A^{pro} no produjo ningún efecto aparente (Figura 43C). Como en los extractos de células HeLa, HIV-1 PR hidrolizó eficazmente eIF4GI y PABP. En cambio, MBP-2A^{pro} sólo fue capaz de cortar significativamente eIF4GI, permaneciendo una gran cantidad de eIF4GII intacto (Figura 43D).

En conclusión, mientras la combinación de los cortes de eIF4GI y PABP produce una fuerte inhibición de la traducción, la hidrólisis individual de eIF4GI tan sólo produce efectos parciales.

Según lo observado anteriormente en células HeLa y sus extractos S₁₀, la hidrólisis de eIF4GI y eIF4GII es suficiente para inhibir la traducción (Figura 12 y 39). Para lograr un corte total de eIF4GI y eIF4GII en extractos de células Krebs-2 incubamos los lisados con las cantidades señaladas en la Figura 44 de EMC-2A, poliadenilado o no. La traducción endógena presente en los extractos Krebs-2 decayó correlacionando con el incremento de la dosis de EMC-2A usada, siendo total con la versión poliadenilada de este mRNA (Figura 44A). El análisis de los factores de iniciación por *western blot* reveló que la inhibición de la traducción fue simultánea a la hidrólisis de eIF4GI y eIF4GII (Figura 44B). No obstante, la síntesis de

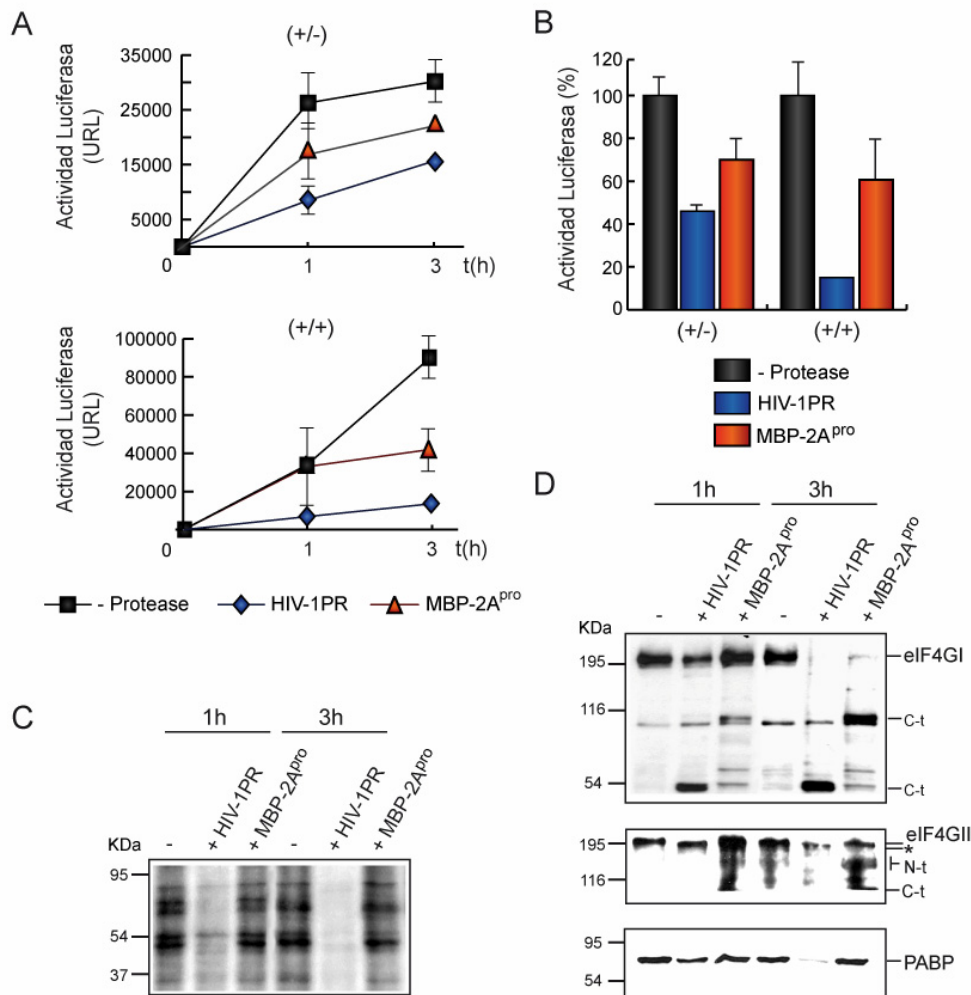


Figura 43. Efectos de HIV-1 PR y MBP-2A^{pro} en traducción en extractos de células Krebs-2 no tratado con nucleasa. Los extractos de Krebs-2 no tratados con nucleasa se programaron con 50 ng de los mRNAs de Luc (+/-) y (+/+). Tras 8 min de incubación, se añadieron 20 ng de HIV-1 PR o 5 µg de MBP-2A^{pro}. Se realizó un marcaje radiactivo de proteínas 1 h antes de detener la reacción. A) Los extractos fueron analizados 1 y 3 h después de iniciar la traducción mediante medida de la actividad Luc obtenida a partir de los mRNAs (+/-) (gráfica superior) o (+/+) (gráfica inferior). B) La actividad Luc relativa a las 3 h, obtenida de tres experimentos independientes, se muestra en la gráfica, indicando la D.E. relativa a cada punto. C) Fluorografía y autorradiografía D) Análisis por *western blot* del estado de eIF4GI (panel superior), eIF4GII (panel intermedio) y PABP (panel inferior) en los extractos 1 y 3 horas después del inicio de la reacción.

2A^{pro} tuvo lugar en esas condiciones, indicando que la traducción dirigida por el IRES de EMCV seguía activa (Figura 44A). La inhibición de la síntesis de proteínas no se debió a la competición del mRNA exógeno por los ribosomas, ya que la adición de 50 ng del mRNA (E/+) (Figura 20), equivalente al EMC-2A poliadenilado, no indujo ningún efecto inhibitorio (datos no mostrados).

Por tanto, la hidrólisis de eIF4GI y eIF4GII o de eIF4GI y PABP constituyen dos alternativas para inhibir la síntesis de proteínas. Esto explica que todas la proteasas de retrovirus empleadas en este trabajo sean capaces de inhibir la traducción en células en cultivo o en sistemas *in vitro*, independientemente de que hidrolicen eIF4GI y eIF4GII o eIF4GI y PABP (Alvarez, E. y col., 2003).

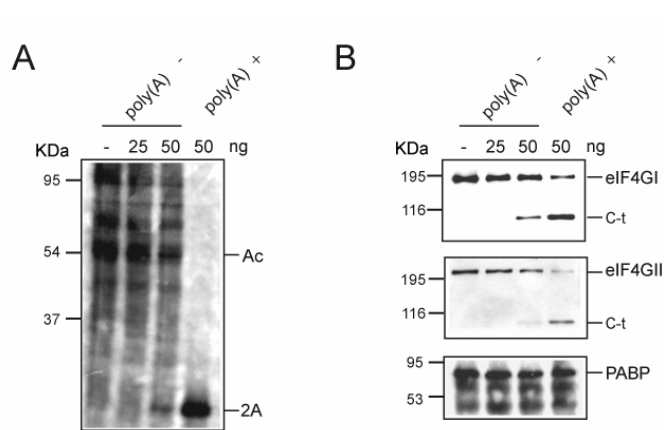


Figura 44. Impacto en la síntesis de proteínas de 2A^{pro} producida a partir de EMC-2A en extractos de células Krebs-2 no tratados con nucleasa. Los extractos de Krebs-2 no tratados con nucleasa se programaron con 25 ó 50 μ g de EMC-2A o 50 ng de EMC-2A-poli(A). La mezcla de reacción se preparó con [S^{35}]-met/cys y se detuvo 1 h después del inicio de la incubación. A) Fluorografía y autorradiografía. B) *Western blots* usando anticuerpos frente a eIF4GI (panel superior), eIF4GII (panel intermedio) y PABP (panel inferior). 2A, proteasa 2A genuina del PV.

3.3.7. HIV-1 PR inhibe la traducción dependiente de cola de poli(A) mediante el corte de PABP.

El hecho de que en extractos de células HeLa y Krebs-2 la traducción de los mRNAs poliadenilados de Luc se inhibiera en mayor medida que sus homólogos sin cola de poli(A) en presencia de HIV-1 PR, sugiere que esta proteasa induce un bloqueo en la iniciación de la traducción dependiente de cola de poli(A) (Figuras 38C y 39C). Para estudiar el papel del corte de PABP en esa inhibición, se cargaron los extractos de células Krebs-2 y RRL con los mRNAs de Luc (-/+) o (-/-) (Figura 18A) y, a los 8 min de incubación, se añadió HIV-1 PR, la proteasa del PV 3C-His o MBP-2A^{pro}. En los extractos de células Krebs-2 la cola de poli(A) estimuló ~4 veces la síntesis de Luc a partir del mRNA (-/+) respecto al mRNA (-/-), que carecía de ella. Este resultado pone de manifiesto la capacidad reguladora de PABP en este sistema (Figura 45A) (Kahvejian, A. y col., 2005). En cambio, la traducción del mRNA de Luc (-/-) fue similar a la de su homólogo (-/-) en RRL, denotando la ausencia de regulación dependiente de PABP en esos extractos (Figura 45B) (Michel, Y.M. y col., 2000). La adición de HIV-1 PR a los lisados Krebs-2 indujo una inhibición del 60% en la traducción del mRNA (-/+), siendo ésta acompañada de la hidrólisis de eIF4GI y PABP (Figura 45A). Sin embargo, esta proteasa no ejerció ningún efecto en la traducción del mRNA (-/-) en estos extractos, ni en la síntesis de Luc a partir de cualquiera de los dos mRNAs en RRL (Figura 45A y B). Por tanto, HIV-1 PR es capaz de impedir la traducción dependiente de la cola de poli(A). En cambio, MBP-2A^{pro} inhibió tan sólo moderadamente la síntesis de Luc a partir del mRNA (-/+) y no produjo ningún efecto sobre el mRNA (-/-) en extractos de células Krebs-2 (Figura 45A). Como HIV-1 PR, tampoco indujo ninguna alteración en el ratio de traducción de los mRNAs (-/+) y (-/-) en RRL (Figura 45B). Esta proteasa hidrolizó eficazmente eIF4GI, pero no eIF4GII, tanto en Krebs-2 como en RRL (Figura 45D). 3C^{pro}-His inhibió completamente la síntesis de Luc en todos los extractos y con todos los mRNAs probados, a pesar de que sólo pudimos detectar el corte de PABP (Figura 45A y B). Por tanto, la capacidad de la 3C^{pro} del PV de inhibir la

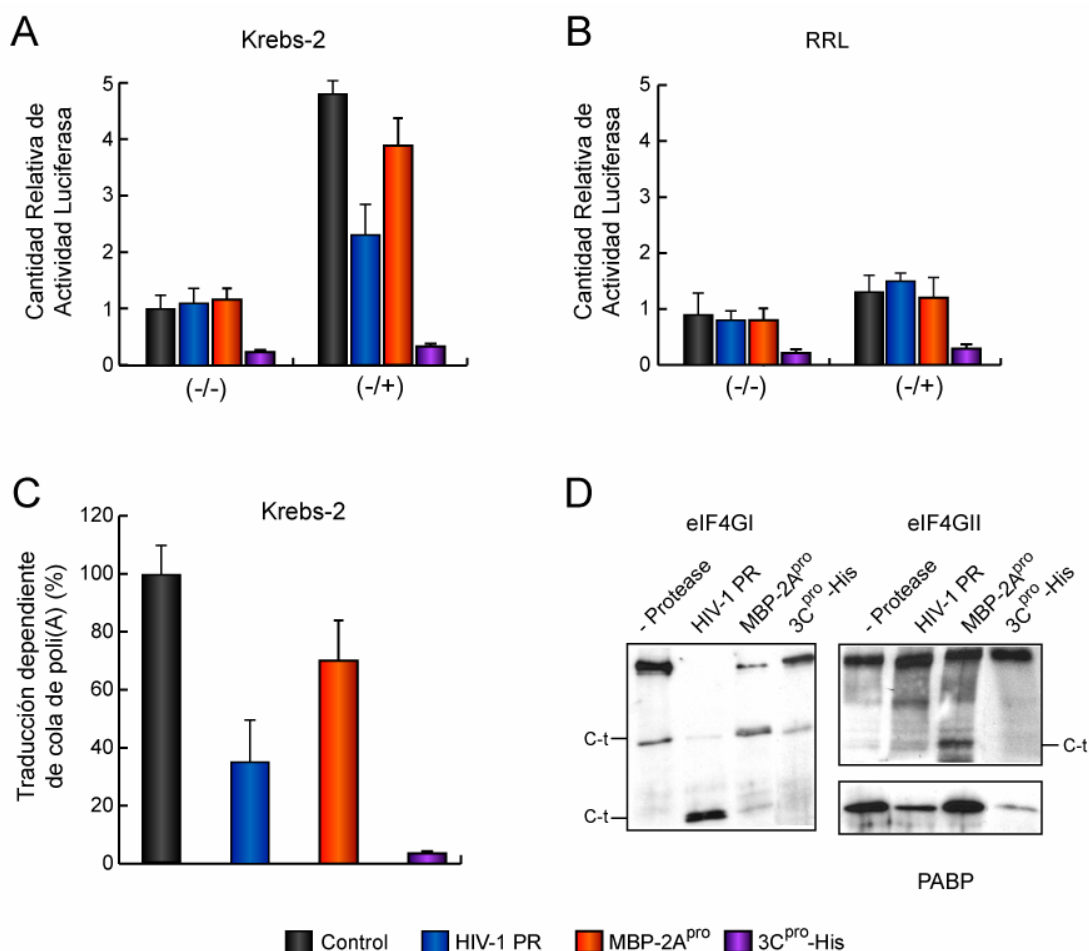


Figura 45. Impacto de HIV-1 PR, MBP-2A^{pro} y 3C^{pro}-His en la traducción dependiente de cola de poli(A) en extractos de células Krebs-2. Se cargaron los extractos de células Krebs-2 no tratados con nucleasa o RRL con 250 ng de los mRNAs de Luc (-/-) y (-/+). A los 8 min se añadieron 20 ng de HIV-1 PR o 3C^{pro}-His o 5 µg de MBP-2A^{pro}. Los extractos fueron analizados a las 2h del inicio de la reacción midiendo la actividad Luc y mediante *western blotting*. A) Cantidad relativa de actividad Luc detectada en extractos de Krebs-2. B) Cantidad relativa de actividad Luc obtenida en RRL. En A y B las barras de error representan la D.E. obtenida de tres mediciones independientes. C) % de traducción dirigido por la cola de poli(A) en extractos de células Krebs-2. Los datos fueron obtenidos a partir de los resultados de 2 experimentos independientes mediante la substracción de la actividad Luc obtenida del mRNA (-/-) de la producida por el (-/+) en extractos de células Krebs-2. D) *Western blots* con los anticuerpos frente a eIF4GI (panel izquierdo), eIF4GII (superior derecho) y PABP (inferior derecho) en RRL.

traducción de mRNAs poliadenilados y no poliadenilados en distintos extractos implica que esta proteasa debe hidrolizar otros factores relacionados con la síntesis de proteínas.

Por tanto, la hidrólisis de eIF4GI por sí misma tan sólo inhibe moderadamente la traducción dependiente de cola de poli(A) (Figura 45C, barra roja), mientras que la combinación del corte de eIF4GI y de PABP lo hace de forma eficaz (Figura 45C, barra azul).

3.3.8. Efecto de la hidrólisis de PABP en la traducción dirigida por el IRES de EMCV.

Pese a que el papel de la hidrólisis de eIF4GI y eIF4GII en la traducción dirigida por los IRES de picornavirus ha sido estudiado en detalle previamente, los efectos del corte de PABP

no han sido analizados aún. Con este fin, se cargaron extractos de células HeLa, Krebs-2 y RLL con los mRNAs de Luc (E/-) o su homólogo poliadenilado (E/+) (Figura 20). La presencia de la cola de poli(A) incrementó la traducción de estos mRNAs ~5 veces, salvo en RLL, donde no se apreció diferencia alguna entre ellos (Figura 46A, C y E, barras negras).

La hidrólisis de eIF4GI y eIF4GII, inducida por MBP-2A^{pro} en células HeLa, incrementó la síntesis de Luc a partir de los mRNAs (E/-) y (E/+) comparado con los respectivos controles (Figura 46A, barras rojas frente a negras). Sin embargo, esta estimulación fue mucho más

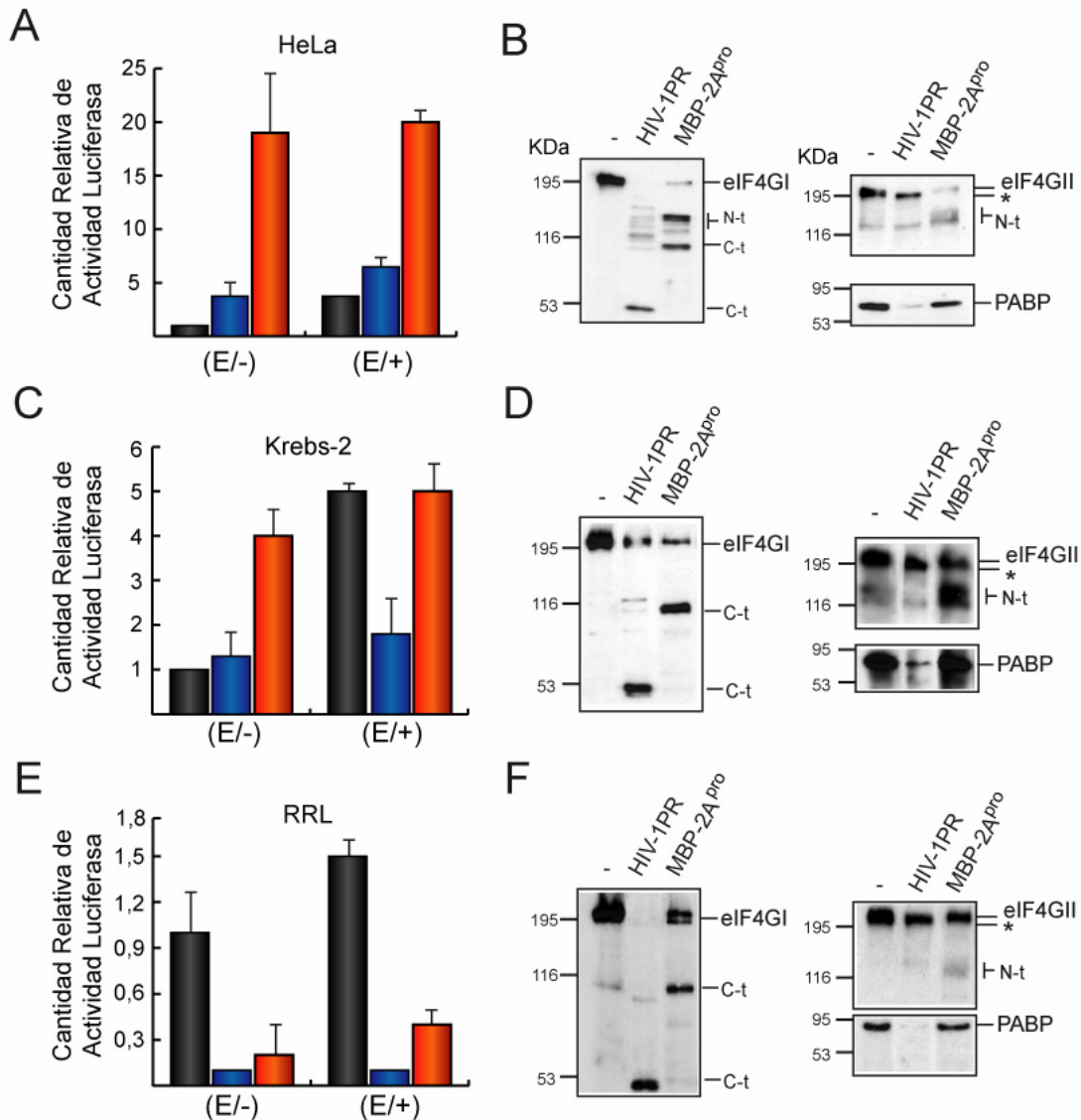


Figura 46. Efecto de HIV-1 PR y MBP-2A^{pro} en la traducción dirigida por el IRES de EMCV en sistemas libres de células. Se programaron extractos de células HeLa, Krebs-2 o RRL con 50 ng de los mRNAs de Luc (E/-) o (E/+). A los 8 min se añadió 20 ng de HIV-1 PR o 5 µg de MBP-2A^{pro}. Los extractos fueron analizados después de 1 h desde el inicio de la reacción midiendo la actividad Luc y mediante *western blotting*. La actividad Luc relativa procedente de cada tipo de extracto se representa en los paneles A, C y E. Las barras negras corresponden a los extractos control, los extractos tratados con HIV-1 PR se representan en azul y con MBP-2A^{pro} en rojo. Las barras de error representan la D.E. obtenida de 3 experimentos independientes. Los paneles B, D y F muestran los *western blots* usando anticuerpos frente a eIF4GI (izquierda), eIF4GII (superior derecha) y PABP (inferior izquierda).

significativa en el caso del mRNA (E/-) que en el del (E/+) (18 veces frente a 5, respectivamente), a pesar de que el valor real de actividad Luc fue el mismo con los dos mRNAs (Figura 46A, barras rojas). Estos resultados se reprodujeron en lisados de células Krebs-2, donde MBP-2A^{pro} estimuló la traducción del mRNA (E/-) hasta el nivel de su homólogo (E/+) (Figura 46A, barras rojas). Nuestros datos coinciden con los obtenidos previamente con inhibidores específicos de la traducción dependiente de cola de poli(A) (Paip-2 y Nsp3A de rotavirus) y sugieren que la actividad de la proteasa elimina la contribución de la cola de poli(A) a la traducción (Michel, Y.M. y col., 2001, Svitkin, Y.V. y col., 2001). No obstante, la estimulación de la traducción dirigida por el IRES de EMCV por el corte de eIF4G contrarresta la pérdida de la traducción dependiente de la cola de poli(A). Además, estos datos están de acuerdo con los resultados obtenidos en la Figura 21. En contraste con lo observado en los extractos sinérgicos, MBP-2A^{pro} inhibió en RRL la síntesis de Luc a partir de (E/-) y (E/+), probablemente por la ausencia de algún factor implicado en la iniciación de la traducción dirigida por el IRES de EMCV (Figura 46E, barras rojas) (Novoa, I. y col., 1997).

En extractos de células HeLa, HIV-1 PR estimuló moderadamente la síntesis de Luc a partir de los mRNAs (E/-) y (E/+) con respecto a sus respectivos controles, en condiciones en las que eIF4GI y PABP estaban hidrolizados (Figura 46A y B). Por tanto, la proteasa de retrovirus no hizo descender el ratio de traducción de estos mRNAs respecto de los extractos control, sugiriendo que el corte de PABP no inhibe la traducción dirigida por el IRES de EMCV. El mismo efecto se observó en extractos de células Krebs-2, salvo porque en este caso, la estimulación de la traducción dirigida por el IRES inducida HIV-1 PR no fue suficiente para

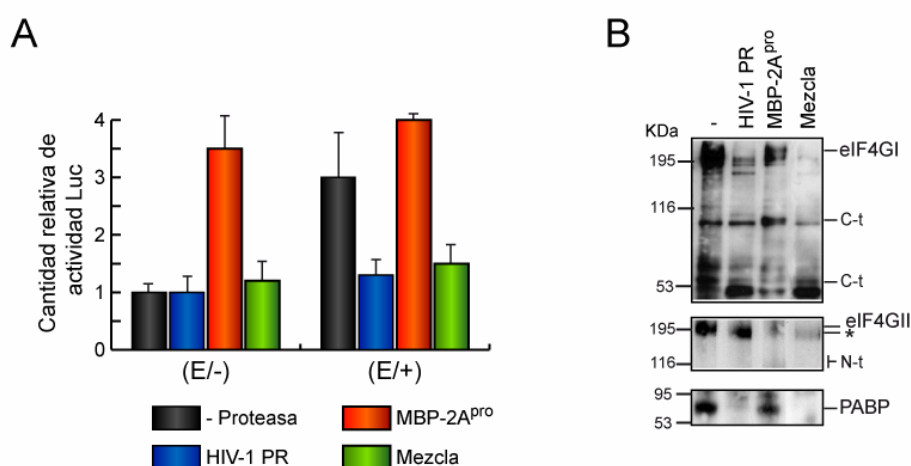


Figura 47. Doble tratamiento con HIV-1 PR y MBP-2A^{pro} en extractos de células Krebs-2. Efectos en la traducción dirigida por el IRES de EMCV. Los extractos de células Krebs-2 no tratados con nucleasa se programaron con 50 ng de los mRNAs de Luc (E/-) o (E/+). A los 8 min se añadieron 20 ng de HIV-1 PR, 5 µg de MBP-2A^{pro} o una mezcla de las dos proteasas (20 ng de HIV-1 PR + 5 µg de MBP-2A^{pro}). Una hora después de la iniciación de las reacciones, la síntesis de proteínas fue detenida con tampón de Luc. A) Análisis de la actividad Luc. Las barras de error representan la D.E. de dos experimentos independientes. B) *Western blots* usando los anticuerpos contra eIF4GI (panel superior), eIF4GII (panel intermedio) y PABP (panel inferior).

contrarrestar la pérdida de la traducción dependiente de cola de poli(A) (Figura 46C, barras azules). De nuevo, en RRL la síntesis de Luc a partir de (E/-) y (E/+) se inhibió por la actividad de HIV-1 PR (Figura 46E, barras azules).

En definitiva, la diferencia entre las dos proteasas virales reside en su capacidad para estimular la traducción dirigida por IRES de EMCV, siendo superior la de MBP-2A^{pro} que la de HIV-1 PR.

Para determinar si MBP-2A^{pro} puede estimular la traducción interna en presencia de HIV-1 PR, se añadieron la dos proteasas por separado o en una mezcla de ambas a extractos de células Krebs-2, y se recogieron los lisados 1 h después. Con las proteasas por separado se observó un resultado similar al obtenido en la Figura 46 (Figura 47A). Sorprendentemente, la actividad Luc detectada en los lisados tratados con HIV-1 PR y MBP-2A^{pro} fue comparable a la obtenida con los tratados solamente con HIV-1 PR (Figura 47A, barra azul frente a verde).

En conclusión, HIV-1 PR produce cambios en la maquinaria de síntesis de proteínas que no pueden ser contrarrestados por la actividad proteolítica de 2A^{pro}.

3.4. PAPEL DEL eIF4G EN LA EXPRESIÓN DEL VIRUS SINDBIS.

En el cuarto y último objetivo de esta tesis doctoral nos propusimos determinar el efecto de la hidrólisis de eIF4G por proteasas virales en la expresión génica del virus sindbis (SV). El SV es un virus RNA de polaridad positiva perteneciente a la familia *Togaviridae*. Hay dos características que hacen este virus atractivo para este estudio: i) Posee dos fases claramente diferenciadas de expresión génica: En la primera se traduce el RNA genómico (49S) para dar lugar a las proteínas no estructurales (nsPs), coexistiendo con la síntesis de las proteínas celulares. En la etapa tardía, el mRNA subgenómico (26S) del virus monopoliza la maquinaria de síntesis de proteínas, produciéndose las proteínas estructurales (sPs), mientras que la traducción de los mRNAs celulares se inhibe. ii) Los mRNAs del SV tienen *cap* y cola de poli(A) y no poseen IRES. No obstante, el mRNA 26S no se traduce por la vía canónica, puesto que puede emplear eIF2a en lugar de eIF2 α (Ventoso, I. y col., 2006). El mRNA subgenómico de SV posee dos secuencias de interés: una secuencia líder corta (49 nts), carente de estructura secundaria, y una estructura en horquilla en los 175 primeros nts de región codificante para la proteína de la cápsida (C), que se ha relacionado con la traducción selectiva de este mRNA en la fase tardía de la infección y con su independencia de eIF2 α (Frolov, I. y Schlesinger, S., 1996, Ventoso, I. y col., 2006). En este objetivo intentamos, por tanto, estudiar la participación del complejo eIF4F en la iniciación de la síntesis de proteínas de los mRNAs 49S y 26S del SV.

3.4.1. Producción de SV recombinantes que expresan HIV-1 PR o 2A^{pro}. Efecto en la síntesis de proteínas, en la replicación viral y en la producción de partículas infectivas.

Para expresar las proteasas de HIV-1 o 2A del PV simultáneamente con la fase tardía de la infección del SV, realizamos varias construcciones plasmídicas emplazando el gen *pr* de HIV-1 (SV-PR) o el *2A* del PV (SV-2A) tras un promotor subgenómico extra, tal y como describió M.A. Sanz (Sanz, M.A., 1998) (Figura 48A). El RNA genómico de estos virus se obtiene transcribiendo *in vitro* el plásmido correspondiente con la RNA polimerasa T7 y se transfecta en células BHK mediante electroporación. Una vez el RNA genómico se encuentra en el citoplasma de la célula se traduce para producir las nsPs, que iniciarán la replicación/transcripción del RNA transfectado. Este proceso da lugar a: más RNAs genómicos 49S, que serán encapsidados en etapas tardías; mRNAs subgenómicos 26S, que darán lugar a las proteínas estructurales del virus y mRNAs subgenómicos secundarios, que portarán la secuencia de las proteasas. Una vez obtenidos los distintos plásmidos se transcribieron y se electroporaron los RNAs resultantes en células BHK. Se realizó un marcaje radiactivo de proteínas de la 7-8 hpe, recogiendo las células inmediatamente después. De acuerdo con resultados anteriores, la expresión de HIV-1 PR y 2A^{pro} se produjo a partir de las 3-4 hpe, coincidiendo con el silenciamiento de la síntesis de proteínas celulares y el inicio de la

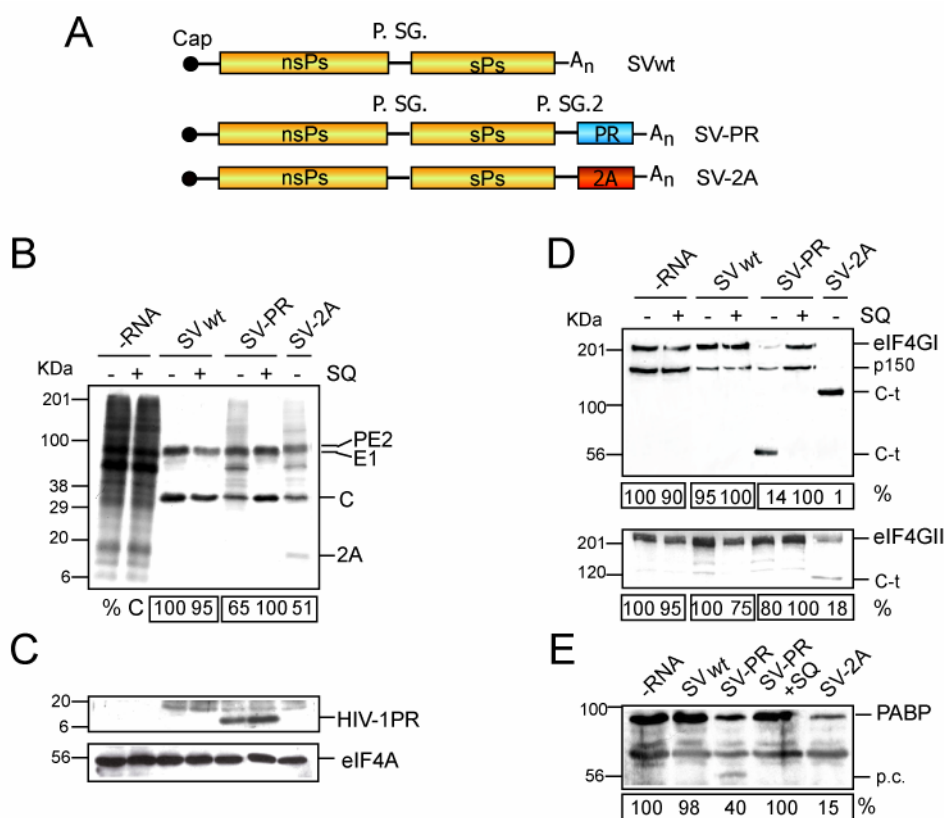


Figura 48. SVs recombinantes que expresan la proteasa de HIV-1 o 2A^{pro} de PV. Efecto en la síntesis de proteínas virales. A) Dibujo esquemático del virus SV silvestre (SVwt) y de los dos virus recombinantes: SV-PR y SV-2A. Las células BHK-21 se electroporaron con 30 μ g de los RNAs transcritos *in vitro* SVwt, SV-PR y SV-2A y se incubaron en presencia o ausencia de SQ (12 μ M). A las 7 hpe, se realizó un marcaje radiactivo de proteínas durante 1 h. A las 8 hpe las muestras fueron analizadas por fluorografía y autorradiografía (B). También se realizaron *western blots* usando anticuerpos frente a C) HIV-1 PR (panel superior) y eIF4A (panel inferior) y D) eIF4GI (panel superior), eIF4GII (panel intermedio) y E) PABP. PE2 y E1, glicoproteínas del SV; C, proteína de la cápsida; nsPs, proteínas no estructurales; sPs, proteínas estructurales; P.S.G., promotor subgenómico; P.S.G.2, promotor subgenómico duplicado; p.c. producto de corte

producción de las proteínas estructurales del SV y, por tanto, con la fase tardía de la infección (datos no mostrados) (Sanz, M.A., 1998). A las 8 hpe, en las células electroporadas con el RNA derivado del clon parental (SV_{wt}) se observó una síntesis cuantiosa de proteínas virales acompañada de una potente inhibición de la traducción celular (Figura 48B). En el caso de los SV-PR y SV-2A, que expresan todas las proteínas del SV y HIV-1 PR o 2A^{pro}, la síntesis de C sufrió una inhibición parcial (~30-60%) respecto de la observada con el SV_{wt}. Este efecto coincidió con un corte casi total de eIF4GI, eIF4GII y PABP en el caso del SV-2A y eIF4GI y PABP con el SV-PR (Figura 48B, D y E). De nuevo, el anticuerpo frente a eIF4GI reconoció en las células BHK la proteína de 150 KDa (p150) que desapareció en presencia de HIV-1 PR y 2A^{pro} (Figura 48D y 25).

La expresión de las proteasas se confirmó mediante autorradiografía en el caso de 2A^{pro} o por *western blot* en el caso de HIV-1 PR (Figura 48B y C). Los cortes inducidos por el SV-PR al igual que la inhibición en la producción de las proteínas virales se evitaron en presencia de SQ. El SQ en si mismo no tuvo ningún efecto nocivo ni para la traducción de los mRNAs

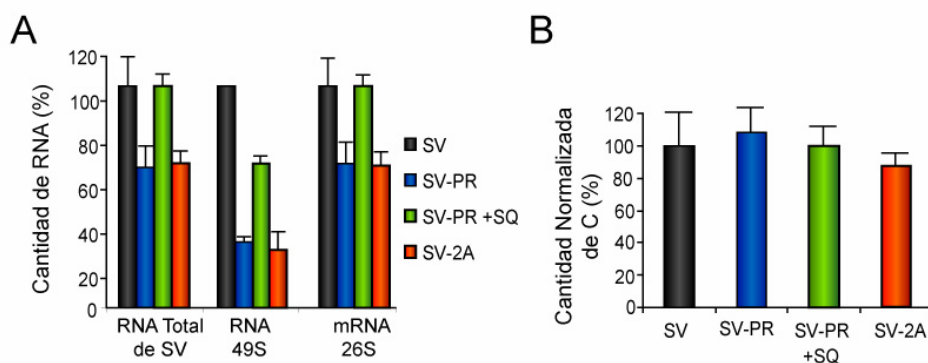


Figura 49. Efecto de HIV-1 PR y 2A^{pro} en la cantidad de los RNAs genómico (49S) y subgenómico (26S) del SV. En paralelo con el experimento anterior las células BHK-21 se electroporaron por triplicado con 30 μ g de los RNAs SV_{wt}, SV-2A y SV-PR y se sembraron en placas de cultivo p60. A las 8 hpe se recogieron en PBS y se aisló el RNA. A) La cantidad de RNA total y genómico del SV fue cuantificada por RT-PCR a tiempo real. La cantidad de mRNA subgenómico se obtuvo según se indica en los materiales y métodos. Las barras de error representan la D.E. B) Empleando los valores de la cantidad de mRNA subgenómico de SV, se normalizaron los datos de síntesis de C obtenidos de tres experimentos independientes.

celulares (Figura 48B, líneas 1 y 2) o virales (Figura 48B, líneas 3 y 4). Por tanto, la hidrólisis de eIF4GI, eIF4GII y PABP, pese a ser suficiente para inducir un bloqueo total de la traducción de los mRNAs celulares, tuvo un efecto parcial en la expresión del SV. En contraste con el SV_{wt} o el SV-PR en presencia de SQ, el SV-PR en ausencia del inhibidor y el SV-2A no indujeron una inhibición total en la síntesis de la actina (Figura 48B). Una posible explicación para este resultado es que mientras que el SV_{wt} y el SV-PR en presencia de SQ dan lugar a una infección productiva, de modo que las partículas virales producidas infectan a las células no electroporadas, la actividad de las proteasas virales generadas por el SV-PR y SV-2A podría afectar la producción de la progenie viral.

Para determinar si la menor capacidad del SV-PR y del SV-2A para producir las proteínas estructurales del virus era debida a un déficit en la síntesis de los RNAs virales, cuantificamos mediante RT-PCR a tiempo real los RNAs genómico 49S y subgenómico 26S presentes en esas células. Según la cuantificación obtenida, el SV_{wt} produjo 10 veces más RNA subgenómico 26S que RNA genómico 49S. Este resultado se reprodujo en 4 experimentos independientes (datos no mostrados). La cantidad del mRNA subgenómico 26S producido a partir del SV-PR o del SV-2A fue un 30-50% menor al generado por el SV_{wt} (Figura 49A). No obstante, la síntesis del RNA genómico de estos virus recombinantes se inhibió un 60-80%, sugiriendo que la producción de este RNA era aún más sensible a la actividad de HIV-1 PR o 2A^{pro} que la del subgenómico (Figura 49A). El SQ previno estos efectos en el caso de SV-PR (Figura 49A). La normalización de los datos de síntesis de proteínas estructurales del SV en relación a la cantidad del mRNA subgenómico 26S reveló que la cantidad real de síntesis de la proteína C era similar en todos los casos, independientemente de que expresase proteasa viral o no (Figura 49B).

En definitiva, la hidrólisis de eIF4GI, eIF4GII y PABP no afecta a la traducción del mRNA 26S del SV en las células infectadas.

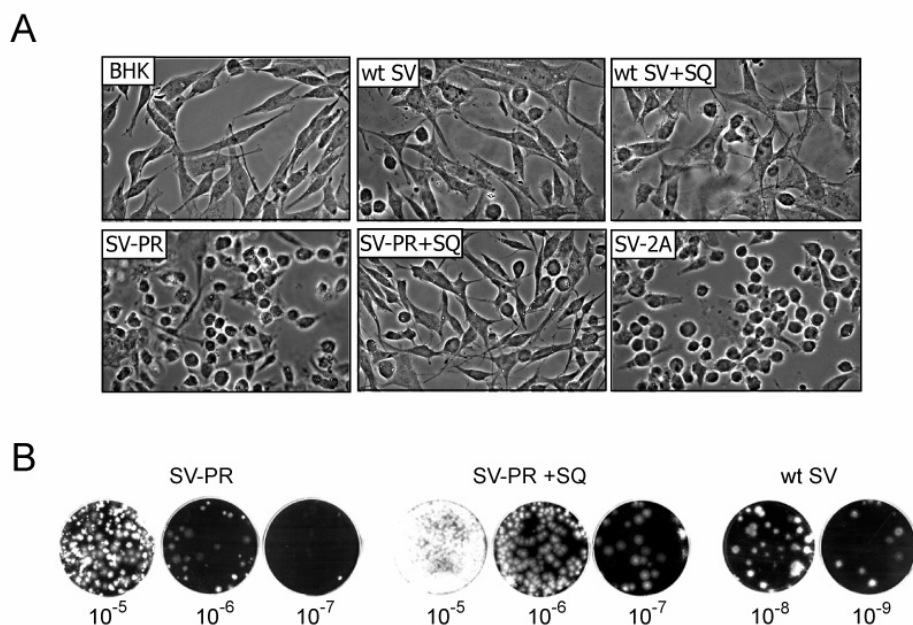


Figura 50. Estudio del efecto citopático y de la producción de partículas virales de los SV recombinantes. A) Las células BHK-21 se electroporaron con 30 μ g de los RNAs SVwt, SV-PR o SV-2A o tampón de transcripción como control. Tras 16 h de incubación en presencia o ausencia de SQ, fueron fijadas y observadas por microscopía óptica de contraste de fases. B) Las células BHK-21 se electroporaron con 30 μ g del RNA SV-PR o del SVwt. Las células se incubaron en presencia de SQ y se recogió los sobrenadantes a las 48 hpe. Las suspensiones virales se titularon en presencia o ausencia de SQ.

Posteriormente se analizó por microscopía óptica de contraste de fase el efecto de las proteasas virales expresadas a partir de los SV recombinantes en la morfología celular. La HIV-1 PR producida por el virus SV-PR indujo a las 16 hpe un incremento en el número de células redondeadas de un 50-80% respecto al SV_{wt}. La presencia de SQ revirtió este fenómeno. El SQ por si mismo no produjo ningún efecto (Figura 50A). También la proteasa 2A del PV aumentó la capacidad del SV para inducir el efecto citopático en más de un 80% (Figura 50A).

Por otro lado, se estudió la capacidad del SV-PR para producir partículas virales infectivas. Para ello, se recogió el sobrenadante de las células electroporadas con el RNA del SV-PR, incubadas durante toda la infección con SQ, y se tituló la suspensión del virus en ausencia y presencia de SQ. La proteasa del HIV-1 indujo un descenso medio en la producción de virus de 200 veces, comparado con un sobrenadante obtenido en las mismas condiciones con el SV_{wt} (Figura 50B). Este efecto fue revertido parcialmente cuando la suspensión de SV-PR se tituló en presencia de SQ, recuperando el título viral 20 veces (Figura 50B). Además, mientras las placas producidas por SV-PR en presencia de SQ presentaban un fenotipo normal, en ausencia del inhibidor convivían placas de fenotipo normal con otras de menor tamaño y contornos irregulares (Figura 50B). Nótese que entre la población viral infectiva presente en los sobrenadantes, aproximadamente un 50% habían perdido su capacidad de expresar una HIV-1 PR activa, tal y como se extrae de su escasa habilidad para inducir la hidrólisis de eIF4GI en subsiguientes infecciones (datos no mostrados) y de la relación en el número de placas pequeñas comparadas con las de fenotipo normal (Figura 50B).

Por tanto, HIV-1 PR inhibe la producción de partículas virales del SV, probablemente, por la reducción en la cantidad del RNA genómico del virus en la célula infectada. Además, las proteasas virales aceleran la inducción del efecto citopático en las células infectadas por el SV.

3.4.2. Efecto del corte de eIF4G en la traducción del RNA genómico de SV.

El RNA genómico (49S) del SV se traduce preferentemente durante la etapa temprana de la infección, coexistiendo con la síntesis de proteínas celulares. Para determinar si este RNA viral requiere para su traducción el complejo eIF4F, el factor eIF4G debe ser hidrolizado previamente a la infección. Por tanto, se precisa de un sistema que induzca una hidrólisis rápida y total de eIF4G. Con este fin decidimos electroporar las células con el mRNA EMC-2A. Otra

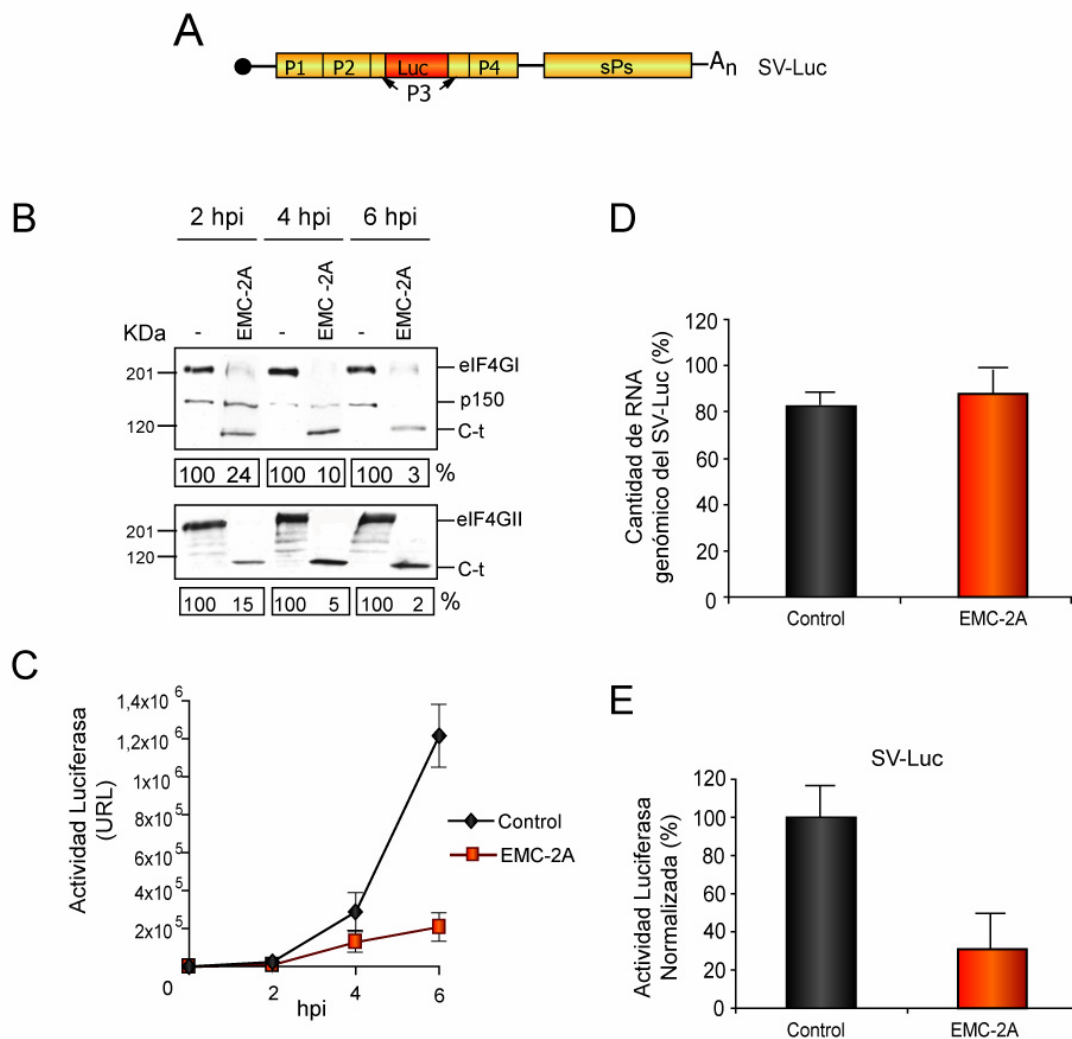


Figura 51. Traducción del RNA genómico del SV-Luc en células que expresan 2A^{pro} del PV. Las células BHK-21 se electroporaron con 30 μ g de EMC-2A o con tampón de transcripción como control. A 1 hpe se infectaron con el virus SV-Luc con una multiplicidad de 3 ufp/célula. A las 2, 4 y 6 hpi se recogieron las muestras para su análisis. A) *Western blotting* con anticuerpos frente a eIF4GI (panel superior) y eIF4GII (panel inferior). B) Análisis de la actividad Luc. C) En paralelo, se recogieron las células electroporadas e infectadas en PBS y se aisló el RNA total. La gráfica representa la cantidad relativa del RNA genómico del SV-Luc a las 2 hpi. D) Los datos de Luc obtenidos a la hora 2 se normalizaron teniendo en cuenta la cantidad del RNA genómico del SV-Luc.

dificultad para estudiar la traducción del RNA 49S es que las nsPs del SV no se pueden detectar mediante marcaje radiactivo de proteínas y autorradiografía, puesto que las proteínas celulares se sintetizan en mayor medida y simultáneamente. Como no se disponía de anticuerpos adecuados frente a las nsPs se adoptó otra estrategia: el virus SV-Luc (Toto1010) (Bick, M.J. y col., 2003). Este virus recombinante contiene el gen *Luc* emplazado en medio de la secuencia de nsP3 (Figura 51A). Así, cuando se traduce el RNA genómico se producen de manera equimolar las nsPs del virus y Luc. Se electroporaron células BHK con 30 μ g de EMC-2A o tampón de transcripción y 1 h después se infectaron con el SV-Luc con una multiplicidad de 3 ufp/célula. En las células transfectadas con el EMC-2A la hidrólisis del eIF4GI y eIF4GII fue total desde las 2 hpi (Figura 51B). En estas condiciones, la actividad Luc detectada fue muy inferior a la obtenida en las células control a lo largo de todo el ensayo (2, 4 y 6 hpe) (Figura 51C).

Para determinar si este efecto era debido a una inhibición de la traducción o en la entrada del virus en las células por la presencia de la 2A^{pro}, se cuantificó el RNA genómico del SV. A las 2 hpe la cantidad del RNA 49S fue similar en las células transfectadas con el EMC-2A y en las células control (Figura 51D). Con el paso de las horas, la cantidad del RNA genómico

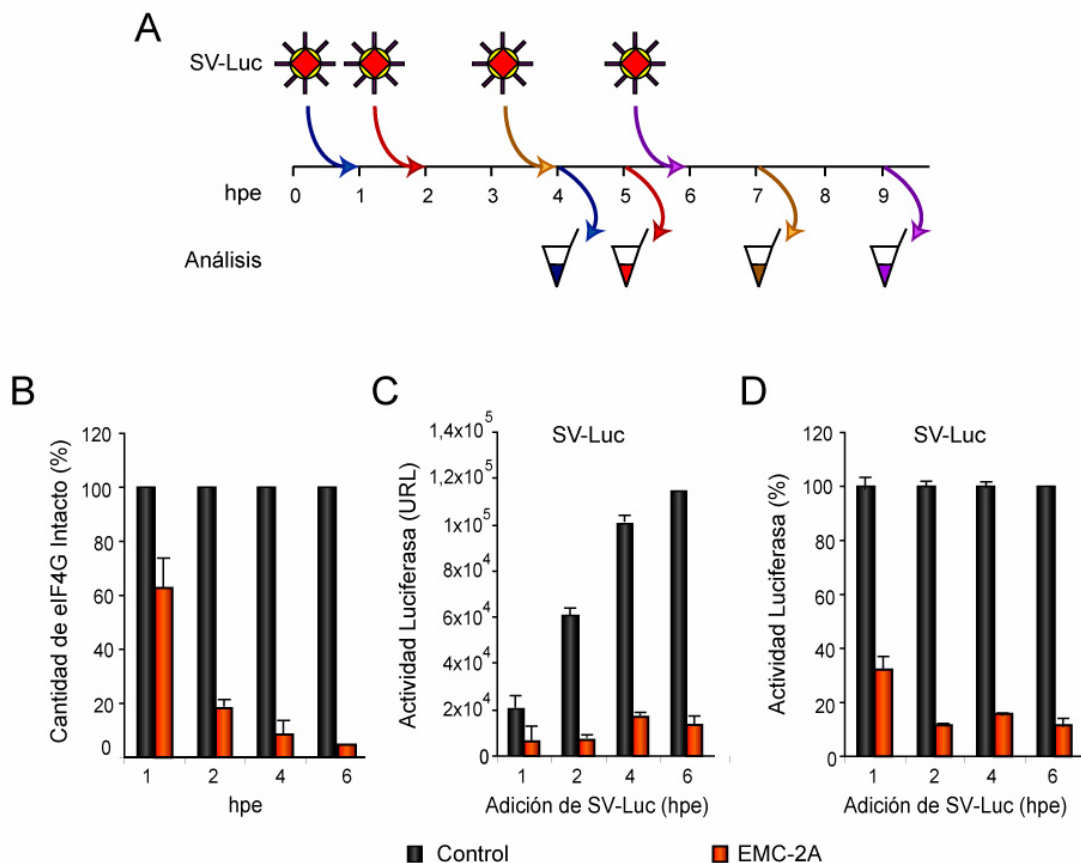


Figura 52. Efecto del corte del eIF4G en la traducción del RNA genómico del SV-Luc. Las células BHK-21 se electroporaron con 30 μ g de EMC-2A o tampón de transcripción como control. Posteriormente, se infectaron con una multiplicidad de 3 ufp/célula con el virus SV-Luc a 1, 2, 4 y 6 hpe. Se recogieron las muestras 3 h después de la adición del virus. A) Representación esquemática del experimento. B) Cantidad relativa de eIF4G total (eIF4GI+eIF4GII) en las células electroporadas en el momento de la infección. C) Actividad Luc detectada en las células infectadas. D) Cantidad relativa de actividad Luc.

presente en las células control aumentó significativamente respecto de las que expresaban 2A^{pro}, posiblemente debido a la inhibición de la síntesis de las nsPs, implicadas en la replicación viral, por el corte de eIF4G (datos no mostrados). Los valores de actividad Luc normalizados en relación a la cantidad de RNA 49S a las 2 hpe, mostraron una inhibición real de la traducción del mRNA genómico del SV de un 80%.

Para estudiar en detalle este fenómeno, se electroporaron células BHK con 30 µg de EMC-2A o tampón de transcripción y posteriormente se infectaron con 3 ufp/célula del SV-Luc a 1, 2, 4 o 6 hpe, midiéndose la actividad Luc 3 h después (Figura 52A). El factor eIF4G se proteolizó de forma dependiente del tiempo: un 40% a 1 hpe, un 80% a 2 hpe y un corte casi total a las 4 hpe (Figura 52B). Así, cuando el virus se añadió a 1 hpe, el corte del eIF4G por la 2A^{pro} produjo una reducción del 65-70% en la síntesis de Luc, comparado con las células control (Figura 52C y D). Además, la inhibición de la traducción del RNA genómico del SV-Luc se incrementó conforme se retrasaba el momento de la infección (Figura 52C y D). De hecho, la cantidad relativa de la actividad Luc correlacionó con la cantidad de eIF4G intacto presente en las células en el momento de la infección (Figura 52 A y D).

En conclusión, la traducción del mRNA genómico 49S del SV es dependiente de la integridad de eIF4G, tal y como ocurre con los mRNAs celulares.

3.4.3. Relevancia de la secuencia líder 26S en la traducción *cap*-independiente de los mRNAs subgenómicos del SV-GFP.

Para determinar la contribución a la traducción no canónica de las secuencias reguladoras presentes en los RNAs del SV, se construyó un SV recombinante que expresa la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP) a partir de un promotor subgenómico duplicado (Figura 53A). Este virus produce 3 tipos de RNAs en la célula infectada: i) el RNA genómico 49S, que es regulado por la secuencia líder 49S; ii) el mRNA subgenómico 26S, que posee la secuencia líder 26S y las estructuras en horquilla presentes en los primeros 175 nt del gen *C* (Frolov, I. y Schlesinger, S., 1994;1996); iii) el mRNA subgenómico duplicado artificial, que posee la secuencia líder 26S seguida por el gen *GFP*, que no dispone de las estructuras en horquilla. Los 3 RNAs comparten la misma región 3' UTR (Figura 53A).

Para determinar el grado de participación del eIF4G en la traducción de cada uno de los RNAs sintetizados por el SV-GFP, se electroporaron células BHK con 30 µg de los mRNAs EMC-2A, EMC-2C o con tampón de transcripción. 2 h antes o 1 h después se infectaron con 10 ufp/célula del SV-GFP. Así, creamos dos condiciones distintas para la expresión génica del virus: i) Cuando la infección se realiza 1 h después de la electroporación, el RNA genómico del SV-GFP se encuentra el eIF4G hidrolizado por la 2A^{pro}. ii) Cuando la infección se produce 2 h antes de la electroporación, la hidrólisis de eIF4G ocurrirá entre la 2^a y la 3^a hpi, momento estimado para el inicio de la fase tardía de la infección y, por tanto, de la traducción de los

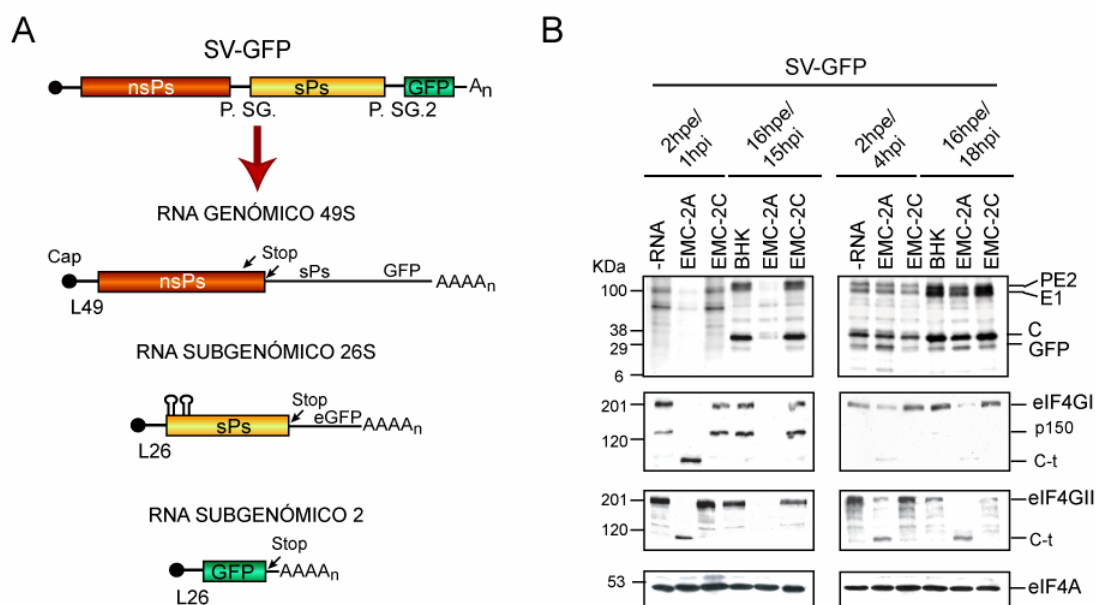


Figura 53. Efecto del corte del eIF4G en la traducción de los RNAs del SV-GFP. Se electroporaron células BHK-21 con 30 μ g de los mRNAs EMC-2A o EMC-2C o con tampón de transcripción como control. 2h antes o 1h después de la electroporación se infectaron con 10 ufp/célula del virus SV-GFP. A las 1 y 15 hpe se realizó un marcaje radiactivo de proteínas durante 1h. A las 2 y 16 hpe se recogieron las muestras y se sometieron a análisis. A) Esquema del SV-GFP y de los RNAs a los que da lugar. B) Fluorografía y autorradiografía (panel superior), *western blots* usando anticuerpos frente a eIF4GI (panel intermedio) y eIF4GII (panel inferior). L49S, secuencia líder 49S; L26S, secuencia líder 26S; Stop, codón de parada de la traducción.

mRNAs subgenómicos. En conclusión, eIF4G se hidrolizó antes de la fase temprana o de la fase tardía de la infección (Figura 53B).

Cuando el eIF4G se cortó antes de la adición del virus, la infección no progresó, observándose un bloqueo completo de la síntesis de proteínas, tanto celulares como virales, en relación con las células control. De hecho, no se pudo detectar la síntesis de las sPs del virus ni siquiera 15 h después de la infección (Figura 53B, paneles izquierdos). Este resultado indica que cuando eIF4G es hidrolizado previamente a la infección el RNA genómico de SV-GFP no puede reclutar los ribosomas, inhibiéndose la producción de las nsPs, necesarias para la replicación viral. Por tanto, de acuerdo con los resultados anteriores, la fase temprana de la infección del SV es *cap*-dependiente. En cambio, cuando eIF4G se proteolizó justo antes de la fase tardía de la infección, se detectó una cantidad elevada de las glicoproteínas PE2 y E1, de la proteína C y de GFP, tanto a las 4 hpi como a las 16 hpi (Figura 53B, paneles derechos). Por tanto, la disrupción del complejo eIF4F, inducida por la 2A^{pto}, no afectó a la etapa tardía del ciclo viral. El hecho de que la síntesis de GFP no se inhiba por la acción de la proteasa sugiere que la secuencia líder 26S es suficiente para promover la traducción no canónica del mRNA subgenómico del SV.

3.4.4. Análisis de la secuencia líder 26S. Requerimiento de los mRNAs subgenómicos quimera de eIF4G para su traducción.

En el apartado anterior se muestra como la secuencia líder 26S del mRNA subgenómico del SV parece ser el requisito mínimo para que este mRNA se traduzca de manera no canónica en las células infectadas. Esta secuencia posee tan sólo 49 nt y no contiene estructura secundaria. Por tanto, para determinar si la secuencia primaria influye en esta propiedad se construyeron nuevas variantes del SV-GFP que portan deleciones en la secuencia líder del mRNA subgenómico duplicado que codifica para GFP. En concreto, se construyeron 3 variantes: $\Delta 11-31$, $\Delta 31-49$ y $\Delta 11-49$ (Figura 54A). Los primeros 11 nucleótidos de la secuencia líder 26S no se pudieron eliminar por estar directamente implicados en la transcripción del mRNA subgenómico (Levis, R. y col., 1990). Una vez amplificados los distintos virus, se procedió a infectar células BHK con ellos. A las 2 hpi se electroporó con 30 μg de EMC-2A, de EMC-2C o con tampón de transcripción. Como se observa en la Figura 54B, la expresión de GFP a partir del virus $\Delta 11-49$ fue del 20-30% y del 50-80% en el caso del $\Delta 11-31$ en relación con la obtenida del SV-GFP original. Sin embargo, el mutante $\Delta 31-49$ dio lugar a una expresión de GFP similar a la del SV-GFP (Figura 54B, panel inferior). Como se ha determinado posteriormente en nuestro laboratorio con otras construcciones similares, la disminución en la expresión de GFP a partir de los virus $\Delta 11-49$ y $\Delta 11-31$ es posiblemente debida a un déficit en la transcripción del mRNA subgenómico desde el promotor duplicado y no a una inhibición de

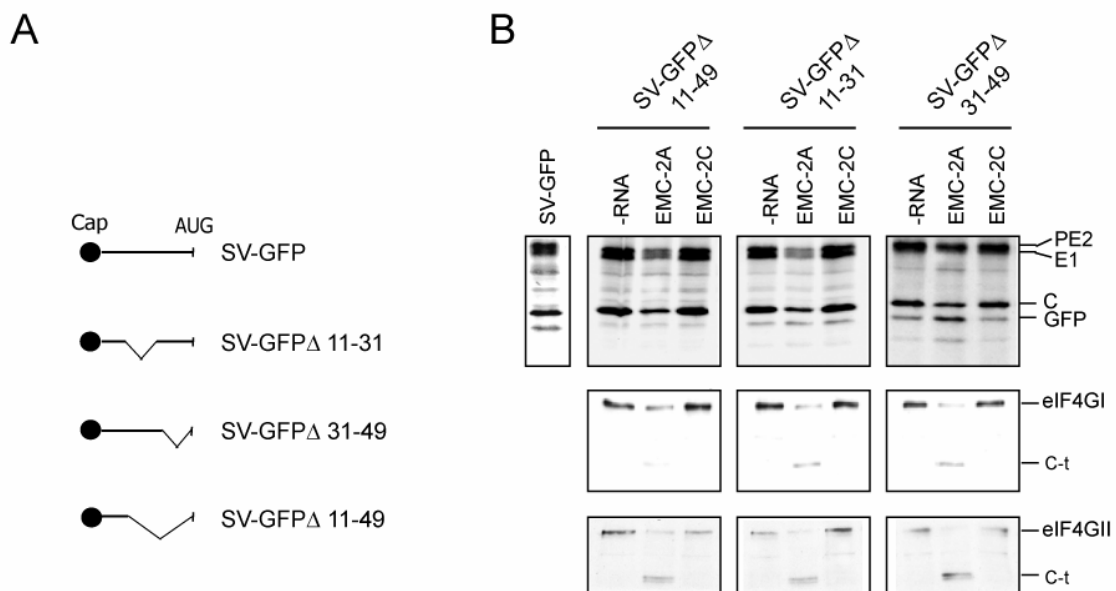


Figura 54. Mapeo de la secuencia líder 26S. A) Dibujo esquemático de las secuencias líder 26S que precede a GFP en los mutantes de deleción del SV-GFP $\Delta 11-31$, $\Delta 31-49$ y $\Delta 11-49$. Los ángulos indican las secuencias delecionadas. B) Se infectaron células BHK con 10 ufp/célula de cada virus. A las 2 hpe las células infectadas se electroporaron con 30 μg de EMC-2A o EMC-2C o con tampón de transcripción como control. A las 15 hpe se procedió a un marcaje radiactivo de proteínas durante 1h, recogiendo las muestras a las 16 hpe. El panel superior muestra la síntesis de proteínas por fluorografía y autorradiografía. El panel intermedio e inferior muestran los *western blots* empleando anticuerpos frente a eIF4GI y eIF4GII respectivamente.

la traducción (datos no publicados). Probablemente, el complejo de replicación del SV necesita los primeros 31 nts de la secuencia líder 26S para producir una actividad máxima.

Por otro lado, la hidrólisis de eIF4GI y eIF4GII por la 2A^{pro} no afectó en ningún caso la expresión de GFP respecto a sus respectivos controles (Figura 54B). Por tanto, la capacidad del mRNA subgenómico 26S del SV de traducirse de manera no canónica puede ser debido a: i) A los 11 primeros nucleótidos de esta secuencia, que no pudieron ser eliminados. ii) A las propiedades intrínsecas globales de esta 5' UTR, como son la escasez de estructura secundaria, lo que podría disminuir la necesidad de helicasas de RNA como eIF4A, o facilitar el *scanning* del complejo 43S.

3.4.5. Efecto del corte de eIF4G en la traducción de mRNAs subgenómicos exógenos del SV transfectados en células de mamífero.

Para determinar si en las células no infectadas los mRNAs subgenómicos de SV se traducen de manera *cap*-dependiente o *cap*-independiente, se sintetizaron *in vitro* 3 mRNAs diferentes: 1) LL-Luc, compuesto por la secuencia líder de Luc seguido por el gen *Luc*. 2) L26S-Luc, que posee la secuencia líder 26S seguida por el gen *Luc*. 3) L26S-C-Luc, que se compone de la secuencia líder 26S seguido por el gen *C* del SV y *Luc*. Los 3 mRNAs contenían

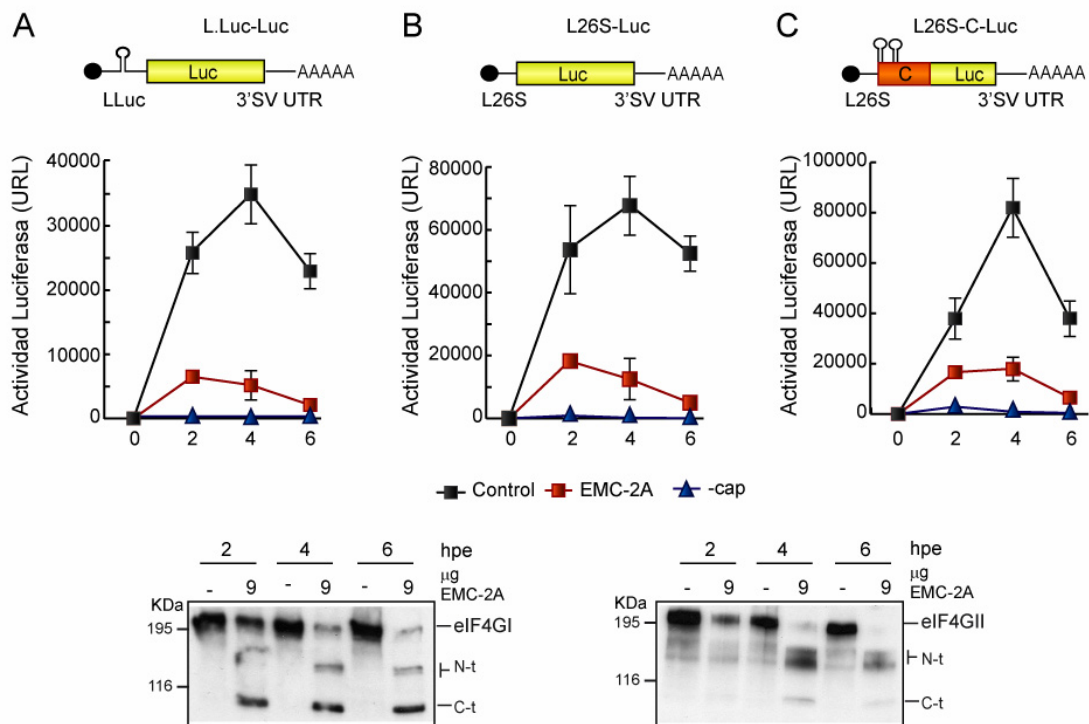


Figura 55. Traducción de los mRNAs de luciferasa que contienen secuencias del mRNA subgenómico de SV en células que expresan 2A^{pro} de PV. Se produjeron por transcripción *in vitro*, los 3 mRNAs quimeras (A, B y C, esquema superior) con y sin estructura *cap*. A, B y C) Electroporamos células HeLa con 9 µg de cada mRNA de Luc con 9 µg de EMC-2A o tampón de transcripción como control. En paralelo, electroporamos 10 µg de una versión sin *cap* de cada mRNA. A las 2, 4 y 6 hpe se recogieron las muestras para medir la actividad Luc presente en cada extracto. Las barras de error representan la D.E. de 3 mediciones independientes. D) Los extractos se analizaron por *Western blotting* con anticuerpos contra eIF4GI (panel izquierdo) y eIF4GII (panel derecho). LLuc, secuencia líder de Luc; 3'SV UTR, región 3' no codificante del SV.

la región 3' UTR del SV (Figura 55A) (Sanz, M.A. y col., 2007). Se electroporaron pues células con una mezcla de mRNAs que contenían 9 µg del mRNA de Luc objeto de estudio con 9 µg de EMC-2A o tampón de transcripción. En paralelo, se electroporaron 9 µg de una versión sin *cap* de cada mRNA. Sorprendentemente, a las 4 hpe la traducción de los 3 mRNAs se inhibió más de un 90% en presencia de la 2A^{pro}, comparado con las células control (Figura 55A, B y C). Además, la actividad Luc detectada en las células transfectadas con la versión sin *cap* de estos mRNAs fue escasa o nula (Figura 55A, B y C).

Estos datos reflejan que el mRNA subgenómico del SV se comporta como un mRNA celular en las células no modificadas por la infección, ya que requiere que eIF4G esté intacto para traducirse.

DISCUSIÓN

4.1. Efecto de la hidrólisis de eIF4GI y eIF4GII por la proteasa 2A del PV en la traducción de mRNAs celulares y virales.

Una gran variedad de virus animales, tales como ciertos picornavirus, calicivirus o retrovirus, inducen el corte proteolítico de eIFs en las células infectadas para modular la síntesis de las proteínas virales y celulares (Lloyd, R.E., 2006, Prevot, D. y col., 2003). En el caso concreto del PV, su genoma codifica dos proteasas: 2A y 3C, que median la hidrólisis de eIF4GI, eIF4GII y PABP, disminuyendo la eficacia de traducción de los mRNAs celulares. (Lloyd, R.E., 2006). Sin embargo, todavía se sigue estudiando cómo contribuye cada evento proteolítico a la inhibición de la síntesis de proteínas celulares (Lloyd, R.E., 2006, Prevot, D. y col., 2003).

En células HeLa, la expresión de 2A^{pro} a partir del mRNA EMC-2A induce la inhibición de la síntesis de proteínas celulares. No obstante, esta inhibición requiere el corte total de las dos formas de eIF4G (I y II). En contra de los resultados obtenidos por Kuyumcu-Martínez y col., hemos observado que no se necesita el corte adicional de PABP para producir este efecto (Kuyumcu-Martínez, N.M. y col., 2004). Además, el corte de eIF4GI y eIF4GII por 2A^{pro} inhibe eficazmente la traducción dirigida por la estructura *cap* y por la cola de poli(A). Así, el fragmento C-t de eIF4G, generado por la proteasa, puede reclutar los ribosomas puesto que conserva la capacidad de interactuar con eIF3. En cambio, el polipéptido N-t posee los dominios de unión a eIF4E y PABP, necesarios para reconocer el mRNA por su estructura *cap* y su cola de poli(A) (Imataka, H. y col., 1998, Lamphear, B.J. y col., 1993, Lamphear, B.J. y col., 1995). De esta forma, 2A^{pro} desacopla la capacidad de eIF4G de reconocer y unir el mRNA de la de reclutar la subunidad ribosómica 40S.

Hemos observado que las cinéticas de corte de eIF4GI y eIF4GII por 2A^{pro} son diferentes en células HeLa y BHK. Mientras que en células HeLa la forma de eIF4G más susceptible a la acción de la proteasa es eIF4GI, en células BHK resulta la forma más refractaria al corte. Hay que destacar que la cinética de corte de eIF4GII es similar en ambas líneas celulares, de modo que las diferencias radican en la capacidad de 2A^{pro} para reconocer y proteolizar eIF4GI. La comparación de aas entre el eIF4GI de humano y de ratón (no se dispone de la secuencia de hámster) reveló algunos cambios en la secuencia de corte reconocida por 2A^{pro}. En particular, la Thr en P2 está cambiada por Ser, la Thr en P5 por Ala y la Thr en P6 por Pro (nomenclatura Berger and Schechter) (Berger, A. y Schechter, I., 1970). En relación con estos cambios las variaciones de aas en la P2 son muy restrictivas para la proteólisis en *trans* mediada por 2A^{pro} (Hellen, C.U. y col., 1992). El sitio donde la proteasa del PV corta eIF4GII aún no ha sido identificado. No obstante, la secuencia donde la proteasa 2A del HRV (otro enterovirus) hidroliza este factor está conservada en el factor de humano y de ratón (Gradi, Foeger, et al., 2004). Estas observaciones podrían explicar por qué la cinética de corte de eIF4GI por la

proteasa 2A del PV varía de una a otra línea celular, mientras que la de eIF4GII no sufre alteraciones.

Usando células HeLa o BHK hemos observado que la traducción de los mRNAs sintetizados *de novo* es más sensible a la actividad de 2A^{pro} que la de los mRNAs pre-existentes. En concreto, la inhibición de la traducción de los mRNAs de luciferasa sintetizados *de novo* correlaciona con el corte de eIF4GI. En cambio, la traducción de los mRNAs pre-existentes de actina o de luciferasa se bloquea en paralelo con el corte de eIF4GII. El factor eIF4GI forma parte de los complejos de iniciación de la traducción en el citoplasma, pero también se encuentra en el precomplejo de iniciación nuclear, junto con CBP20 y CBP80 (Lejeune, F. y col., 2004, McKendrick, L. y col., 2001). Se ha descrito que HIV-2 PR impide la formación del precomplejo nuclear de iniciación mediante el corte de eIF4GI (Lejeune, F. y col., 2004). Teniendo en cuenta que en nuestros experimentos los mRNAs citoplasmáticos vuelven a reasociarse con los ribosomas tras un choque hipertónico aunque eIF4GI esté proteolizado, podemos concluir que el corte de eIF4GI por 2A^{pro} podría inhibir el tránsito desde el precomplejo nuclear al complejo de iniciación citoplasmático.

Previamente se observó que la inhibición de la síntesis de proteínas celulares no correlaciona con el corte de eIF4GI (Novoa, I. y Carrasco, L., 1999, Perez, L. y Carrasco, L., 1992). Además, otros autores propusieron que esta inhibición ocurría simultáneamente al corte de eIF4GII, tanto en células infectadas con el PV o con el HRV, como durante la apoptosis (Gradi, A. y col., 1998b, Marissen, W.E. y col., 2000a, Svitkin, Y.V. y col., 1999). De acuerdo con estos datos, la inhibición de la síntesis de proteínas inducida por 2A^{pro} tanto en células HeLa y BHK como en sistemas libres de células correlaciona estrechamente con el corte de eIF4GII. De hecho, la proteólisis de eIF4GI no afectó a la traducción ni en células HeLa ni en extractos de células Krebs-2, mientras que la hidrólisis conjunta de eIF4GI y eIF4GII inhibió totalmente la síntesis de proteínas en ambos sistemas. Si consideramos que la población de eIF4GII es de 4 a 10 veces inferior a la de eIF4GI en células HeLa (Kuyumcu-Martinez, N.M. y col., 2004, Prevot, D. y col., 2003), parece sorprendente que eIF4GII pueda soportar por sí sólo la traducción. Sin embargo, los experimentos realizados en células BHK apoyan esta posibilidad, ya que la inhibición de la síntesis de proteínas coincidió con el corte de eIF4GII, pese a que en algunos casos una población considerable de eIF4GI permaneció intacta. Por tanto, en nuestras condiciones experimentales parece que el mayor peso de la iniciación de la traducción lo sustenta eIF4GII.

Por otro lado, síntesis de Hsp70 no se inhibió por la rotura de eIF4GI, a pesar de que más de la mitad de la población de este mRNA se produjo *de novo* como respuesta al choque térmico. Este resultado indica que no todos los mRNAs sintetizados *de novo* requieren eIF4GI para su traducción. En cambio, la síntesis de la Hsp70 se inhibió conforme se hidrolizó eIF4GII, siendo esta inhibición fue inferior a la obtenida con el resto de mRNAs. Este dato indica que la

traducción del mRNA de Hsp70 tiene un requerimiento menor de eIF4GI y eIF4GII que la de los mRNA celulares tipo. La expresión de 2A^{pro} indujo una reducción en la cantidad del mRNA de Hsp70 (Novoa, I. y Carrasco, L., 1999). Sin embargo, el déficit en la síntesis de este mRNA no fue suficiente para justificar el descenso en la producción de la proteína. Además, la expresión de mutantes de 2A^{pro} que no inhiben eficazmente la transcripción produjo también un descenso significativo en la producción de la proteína. Un dato interesante es que la inhibición de la síntesis de Hsp70 en las células BHK correlacionó estrechamente con el corte de eIF4GII. Por tanto, aunque este mRNA no utilice eIF4GI para su traducción, si que necesita eIF4GII. El significado fisiológico de este resultado podría radicar en el hecho de que la quinasa Pak-2 se activa durante el estrés moderado, como es el choque térmico, inactivando eIF4GI (Ling, J. y col., 2005). De este modo, el mRNA de la Hsp70 se ha especializado para traducirse de manera óptima en condiciones en las que eIF4GI no es activo.

Durante las últimas décadas se han considerado que eIF4GI y eIF4GII eran homólogos funcionales. Sin embargo, en los últimos años se han publicado varios trabajos sugiriendo un papel diferente para cada uno de ellos. Por ejemplo, eIF4GI y eIF4GII son inactivados por fosforilación por distintas quinasas, que están a su vez sometidas a diferentes procesos de regulación. Así, mientras que eIF4GI es fosforilado por la quinasa Pak-2 en su dominio de interacción con eIF4E, eIF4GII es fosforilado en la Ser 1156 por la quinasa dependiente de calmodulina I (Ling, J. y col., 2005, Qin, H. y col., 2003). Curiosamente, eIF4GII es fosforilado durante la mitosis celular, y reclutado preferentemente a los complejos de iniciación de la traducción durante la diferenciación celular. En cambio, Pak-2 es una quinasa que se activa en respuesta a estrés (Caron, S. y col., 2004, Ling, J. y col., 2005). Por tanto, la capacidad de eIF4GI y eIF4GII para participar en la iniciación de la traducción puede depender del estado en el que se encuentran las células. Nuestros resultados empleando siRNAs sugieren que la eliminación de una u otra forma de eIF4G en células HeLa da lugar a una inhibición parcial de la síntesis de proteínas y a una menor capacidad para dividirse. En contra de los resultados obtenidos con el EMC-2A, no pudimos observar ningún comportamiento diferente en las células que carecían de eIF4GI o de eIF4GII. No obstante, las células que no disponían de ninguno de los dos factores poseían una capacidad muy reducida de sintetizar proteínas y dividirse. La discrepancia de estos resultados con los obtenidos con la expresión de 2A^{pro} pueden deberse a: i) Que los productos C-t de eIF4GI y eIF4GII, generados por la actividad de la proteasa, actúen como un inhibidores competitivos de la traducción por su capacidad de reclutar eIF3 pero no los mRNAs (Prevot, D. y col., 2003). El hecho de que el corte de eIF4GI o eIF4GII no inhiban en la misma magnitud la síntesis de proteínas podría deberse a la distinta capacidad de los productos C-t procedentes de cada forma de eIF4G para competir por eIF3. ii) Tanto eIF4E como eIF4G son sobreexpresados en ciertas líneas de células transformadas (Fukuchi-Shimogori, T. y col., 1997, Prevot, D. y col., 2003). Así, una disminución del 80% de eIF4GI o eIF4GII puede no ser

suficiente para producir una situación de carencia en la célula. El 20% restante de la proteína podría ser suficiente para mantener moderadamente operativa la maquinaria de síntesis de proteínas.

La proteasa 2A del PV tiene un efecto opuesto en la traducción de los mRNAs celulares y virales. Por un lado, inhibe la producción de proteínas celulares mientras que potencia la traducción dirigida por ciertos IRES de origen viral (Prevot, D. y col., 2003). En nuestros experimentos 2A^{Pro} estimuló la traducción dirigida por los IRES del EMCV y del PV. Como se describió previamente, los mRNAs que contienen IRES de picornavirus se traducen más eficazmente si además disponen de cola de poli(A). Sin embargo, en las células infectadas con el PV se corta tanto eIF4G como PABP, lo que induce el bloqueo de la traducción dependiente de la cola de poli(A) (Svitkin, Y.V. y col., 2001). Nuestros datos sugieren el corte de eIF4G induce un incremento traducción interna suficiente para contrarrestar la inhibición de la iniciación traducción dependiente de la cola de poli(A). Nuestros resultados están de acuerdo con trabajos previos en los que usaron inhibidores de la traducción dependiente de la cola de poli(A) (Michel, Y.M. y col., 2001, Svitkin, Y.V. y col., 2001). Así, la traducción de un mRNA que contiene el IRES del PV y cola de poli(A) se inhibe en presencia de Paip-2. En cambio, esta inhibición no se produce si se añade simultáneamente la proteasa 2A del HRV (Svitkin, Y.V. y col., 2001). En conclusión, el papel de la cola de poli(A) en los mRNAs de picornavirus puede estar restringido a la traducción de los genomas iniciales, procedentes de la desencapsidación de las partículas virales. Además, la cola de poli(A) incrementa la estabilidad de los mRNAs virales. De hecho, nuestros experimentos sugieren que los mRNAs que contienen el IRES del PV son sumamente inestables en la célula hospedadora si no disponen de esta estructura. Esto es debido a que PBCP2 interacciona con un región rica en citosinas de los IRES de picornavirus llamada *coverleaf*, de modo que la interacción PBCP2-PABP hace que el RNA forme un círculo cerrado (Herold, J. y Andino, R., 2001). Se ha postulado que esta conformación evita la degradación de estos RNAs en condiciones hostiles (Murray, K.E. y col., 2001). Sin embargo, esta interacción no es necesaria para estabilizar los RNAs que contienen IRES de tipo II o III, como son los del EMCV o del virus de la hepatitis A (HAV) (Bradrick, S.S. y col., 2007, Walter, B.L. y col., 1999).

4.2. Inhibición del *splicing* y de la exportación de RNAs desde el núcleo por la proteasa 2A del PV.

Durante la replicación de virus en las células hospedadoras se activan programas de expresión génica para impedir la progresión de la infección, aunque, llegado el caso, requiera la muerte de la célula infectada. En paralelo, los virus han desarrollado distintas estrategias para impedir o evadir la respuesta antiviral de la célula (Loo, Y.M. y Gale, M., Jr., 2007). En este sentido, hemos observado que la expresión de la proteasa 2A del PV induce una respuesta

celular que conlleva un aumento en la síntesis de ciertos mRNAs. Sin embargo, la actividad de esta proteasa dificulta la exportación al citoplasma de los mRNAs sintetizados en el núcleo. De hecho, la mayoría de los mRNAs analizados se acumularon en el núcleo y mostraron una menor presencia en el citoplasma celular. Entre ellos cabe destacar mRNAs implicados en la respuesta inmunológica como Cox-2 e IL-6 o en la división y muerte celular como p53 y c-myc. Sin embargo, la distribución del mRNA de β -actina, cuya población es principalmente citoplásmica, no cambió significativamente. Este resultado sugiere que la inhibición del tráfico de mRNAs podría impedir la reacción de la célula ante un cambio en las condiciones fisiológicas, como es una infección viral. De hecho, los daños en la maquinaria de exportación de mRNAs no requieren de la inhibición de la síntesis de proteínas, ya que se observó con la transfección de 1 μ g de EMC-2A. Mediante hibridación *in situ* con OligodT-F hemos detectado que en las células que expresan 2A^{pro} los mRNAs quedan retenidos en el núcleo celular, mientras que la población de mRNAs citoplásmica disminuye progresivamente. Como consecuencia de la expresión de la proteasa aparecieron en el citoplasma gránulos enriquecidos de mRNAs, que probablemente se corresponden con gránulos de estrés. Existen precedentes de proteínas virales que interfieren con la exportación de mRNAs. Tal es el caso de la proteína M del virus de la estomatitis vesicular (VSV), que inhibe la ruta de transporte mediada por Rae1/mrnp41, o NS1 del IV (Faria, P.A. y col., 2005, Fontoura, B.M. y col., 2005, Fortes, P. y col., 1994). La proteína 2A del PV es el primer caso descrito de una proteasa viral que inhibe el transporte nuclear de mRNAs.

Una posible explicación para estos resultados es que la expresión de 2A^{pro} esté induciendo una respuesta celular que desencadena la apoptosis (Calandria, C. y col., 2004, Goldstaub, D. y col., 2000). Sin embargo, en los extractos de células transfectadas con el EMC-2A ninguno de los sustratos característicos de la caspasa-3 estaban proteolizados. No obstante, pudimos apreciar a tiempos muy tardíos (~24-48 h) células donde se observaba la condensación de la cromatina, lo cual sugiere la inducción del programa de muerte celular. Debemos considerar que la infección con el PV y, más concretamente, la actividad de 2A^{pro}, puede inducir en algunas circunstancias la condensación de la cromatina de manera independiente a la apoptosis (Belov, G.A. y col., 2004). Por otro lado, tanto 2A^{pro}, como las caspasa-3 y -9 durante la apoptosis, incrementan la permeabilidad de la membrana nuclear, produciendo la salida de moléculas de tamaño pequeño acumuladas en el núcleo (Belov, G.A. y col., 2004, Faleiro, L. y Lazebnik, Y., 2000). Se ha descrito que este efecto se debe a la disrupción del poro nuclear por la degradación de las nucleoporinas Nup153 y la p62 (Belov, G.A. y col., 2004, Gustin, K.E. y Sarnow, P., 2001;2002). Sin embargo, en nuestros experimentos no se alteró ni la distribución de las proteínas nucleares ni la integridad de la membrana nuclear. Esto sugiere que el incremento de la permeabilidad nuclear es un evento que requiere de una mayor expresión de 2A^{pro} y, por tanto, debe ocurrir a tiempos tardíos del ciclo infectivo del PV.

Curiosamente, 2A^{pro} inhibió el transporte del rRNA 18S y del snRNA U2 del núcleo al citoplasma. Ambos RNAs son exportados por una vía dependiente del complejo CRM1 y de la GTPasa Ran, aunque la molécula adaptadora que lo media es diferente en cada caso. Los snRNAs U requieren el CBC, formado por CBP20 y CBP80, que reconoce su estructura cap, y PHAX como proteína adaptadora. En cambio, el rRNA 18S se exporta asociado con proteínas del ribosoma formando la presubunidad ribosómica 40S, aunque la proteína adaptadora se desconoce (Cullen, B.R., 2000;2003). El hecho de que CRM1 y Ran participen en las dos rutas hace muy sugerente la posibilidad de que 2A^{pro} pueda hidrolizar uno de estos dos factores. Otra posibilidad que también explicaría la inhibición de la exportación de mRNAs (que no emplean el transportador CRM1) es que las alteraciones del poro nuclear por la proteasa viral influyan en la actividad de la maquinaria de transporte de RNAs. La inhibición de la exportación del rRNA 18S podría afectar a la biogénesis de la subunidad ribosómica 40S, disminuyendo su disponibilidad para la traducción. Este efecto podría colaborar activamente en la inhibición de la síntesis de proteínas virales que se da a tiempos tardíos de la infección del PV (~4-6 hpi) (Semler, B.L. y Wimmer, E., 2002).

Por otro lado, 2A^{pro} también inhibió el transporte del mRNA de luciferasa del núcleo al citoplasma. Este mRNA es modificado por la maquinaria celular, por lo que dispone de *cap* y cola de poli(A), pero no sufre *splicing*. En estos casos, los mRNAs no se exportan por la ruta convencional, puesto que el *splicing* es un prerrequisito para que un mRNA sea transportado por ella (Cheng, H. y col., 2006, Luo, M.L. y col., 2001). De este modo, estos mRNAs emplean una ruta alternativa poco eficaz, en la que está involucrado CBC y el transportador CRM1. Por ello, la exportación del mRNA de luciferasa fue menos efectiva que la del resto de mRNAs testados (Relación C/N 1:3). La salida de este mRNA del núcleo se inhibió un 30-60% por la acción de 2A^{pro}. Pese a que esta inhibición es significativa, no es suficiente para producir un descenso del 95% en la expresión de la luciferasa. Por tanto, 2A^{pro} inhibe tanto el transporte como la traducción del mRNA de luciferasa producido *de novo* en las células HeLa X1/5.

Dado que eIF4GI interacciona con el CBC, complejo que participa en el transporte y en el *splicing* de los mRNAs, el siguiente paso fue determinar si su corte podría desempeñar algún papel en la inhibición de la exportación de mRNAs al citoplasma (Cheng, H. y col., 2006). Nuestros resultados sugieren que mientras que el eIF4GI intacto se distribuye por el citoplasma, el producto C-t producido por 2A^{pro} se acumula en el núcleo. En cambio, el producto C-t de eIF4GI, expresado como producto de fusión de GFP en células de mamífero, posee una distribución principalmente citoplásmica (Coldwell, M.J. y col., 2004). Curiosamente, el producto C-t de eIF4GII no aumentó su presencia en el núcleo. Ciertas proteínas implicadas en el transporte de RNAs cambian su distribución ante una inhibición de la exportación, lo cual sugiere que eIF4GI podría participar en este proceso (Culjkovic, B. y col., 2006). Además, la localización del fragmento C-t de eIF4GI fue similar al de la proteína U2AF65, un factor de

splicing presente en los *spekles*. Sin embargo, la exportación de mRNAs no se inhibió ante un descenso significativo de eIF4GI en las células transfectadas con el siRNA si4GI-3. Por tanto, eIF4GI podría formar parte de los complejos de exportación de mRNAs junto con el CBC, aunque su presencia en ellos sea prescindible.

Por último, hemos observado que 2A^{pro} es capaz de afectar al *splicing* de los pre-mRNAs de Fas y MinK en células en cultivo y en extractos nucleares, respectivamente. La magnitud del daño en el *splicing* es proporcional a la cantidad de 2A^{pro} expresada. De este modo, la transfección de 1 µg de EMC-2A dio lugar a un cambio en el patrón de *splicing* del pre-mRNA de Fas, aumentando la formación del producto que contiene los exones 5 y 7. En cambio, cuando se emplearon 9 µg, el procesamiento del pre-mRNA de Fas se inhibió por completo y, con ello, su transporte al citoplasma. Examinamos en esos extractos el estado de diversas proteínas implicadas en el *splicing*, dada su susceptibilidad a la proteólisis mediada por la caspasa-3 o simplemente, por su relevancia en el proceso. Sin embargo, ninguna de las proteínas analizadas fue hidrolizada por 2A^{pro}. Este resultado refrenda que la inhibición del *splicing* no es debida a la activación de las rutas de apoptosis. No obstante, la gemina-3, un componente estructural de las snRNPs U, sí se degradó. No obstante, nuestros resultados en extractos nucleares indican que 2A^{pro} no inhibe todos los pasos del *splicing* en general, sino la liberación del extremo 3' del intrón, proceso que media la snRNP U2. Por tanto, es poco probable que la inhibición del *splicing* tenga lugar por el corte de la gemina-3, puesto que esta proteína está implicada en el ensamblaje de todas las snRNPs U y no de la snRNP U2 en particular (Matlin, A.J. y col., 2005). Además, la eliminación casi total de la gemina-3 por medio de la transfección de siRNAs disminuye la formación de snRNPs U pero no impide el *splicing* (Shpargel, K.B. y Matera, A.G., 2005). Por tanto, nuestros próximos objetivos se centrarán en determinar si 2A^{pro} hidroliza alguna proteína que sea específica de la snRNP U2.

4.3. La proteasa de HIV hidroliza PABP. Efecto en la traducción de mRNAs celulares y virales.

En las células infectadas con HIV-1 la hidrólisis de eIF4GI correlaciona con la inhibición de la síntesis de proteínas. El agente causal de esta proteólisis es HIV-1 PR (Ventoso, I. y col., 2001). Sin embargo, en nuestros experimentos usando el EMC-2A en células HeLa hemos observado que el corte de eIF4GI por separado es insuficiente para inhibir la traducción. Por tanto, cuando se hidroliza eIF4GI su homólogo, eIF4GII, parece ser capaz de mantener la síntesis de proteínas, al menos temporalmente. De acuerdo con nuestros datos, HIV-1 PR debería hidrolizar otros sustratos, además de eIF4GI, para poder bloquear la maquinaria de síntesis de proteínas. Tal y como ocurre con la infección del PV, hemos observado que en las células MT-2 infectadas con HIV-1 se corta PABP, dando lugar a un producto de proteólisis de ~50 KDa.

Mediante la expresión individual de HIV-1 PR en células COS-7 hemos podido comprobar que esta proteasa induce la hidrólisis de PABP. Pero además, hemos observado que HIV-2 PR y MMTV PR también hidrolizan PABP, mientras que las proteasas del MoMLV, del SIV o del HTLV-1 no lo hacen. Por tanto, eIF4GI es un sustrato común para todas las proteasas de retrovirus testadas, en cambio, eIF4GII y PABP no lo son. De hecho, las proteasas que hidrolizan eIF4GI y eIF4GII no cortan PABP, así como las que hidrolizan eIF4GI y PABP no proteolizan eficazmente eIF4GII. Sólo la MMTV PR parece ser capaz de cortar los tres sustratos. Curiosamente, en extractos S₁₀ de células HeLa suplementados con las proteínas recombinantes HIV-1 PR o HIV-2 PR la cinética de corte de PABP coincidió con la de eIF4GI. Así que la inhibición de la síntesis de proteínas en las células infectadas con el HIV podría ser debida al corte de eIF4GI y PABP.

Kuyumcu-Martínez y col. describieron que la proteasa 3C del PV hidroliza PABP entre los aas 437-438 y 537-538, separando el dominio NTD, que contiene los 4 RRM y el motivo de interacción con eIF4G, y el CTD, que interacciona con diversas proteínas implicadas en la regulación de la síntesis de proteínas (Kuyumcu-Martínez, N.M. y col., 2002). Las proteasas 3C del CBV3 y 3C-like del NoV proteolizan la PABP en posiciones similares (Kuyumcu-Martínez, M. y col., 2004, Kuyumcu-Martínez, N.M. y col., 2002). Según estos autores, la hidrólisis de PABP por 3C^{pro} conlleva la inhibición selectiva de la traducción dependiente de la cola de poli(A) (Kuyumcu-Martínez, N.M. y col., 2004). HIV-1 PR y HIV-2 PR hidrolizan de forma directa PABP en posiciones muy próximas a las de las proteasas de picornavirus y calicivirus (aa 410). No obstante, mientras que 3C^{pro} y 3C^{pro}-like dejan intacto el dominio NTD, HIV-1 PR y HIV-2 PR inducen un corte adicional en el RRM3 (aa 237). Como ocurre con 2A^{pro}, HIV-1 PR inhibe en mayor medida la traducción de los mRNAs poli(A)⁺ que la de los poli(A)⁻ en extractos de células HeLa y Krebs-2. Por tanto, HIV-1 PR es capaz de inhibir el sinergismo entre el *cap* y la cola de poli(A) de los mRNAs. Así, el corte de eIF4GI y PABP es tan eficaz inhibiendo la síntesis de proteínas celulares como la hidrólisis de eIF4GI y eIF4GII. De hecho, mientras que el corte en solitario de eIF4GI, inducido por la proteasa recombinante MBP-2A, es insuficiente para inhibir la traducción endógena, la hidrólisis conjunta de eIF4GI y PABP, producido por HIV-1 PR, la inhibe completamente. La traducción endógena tiene lugar a partir de los mRNAs asociados con los ribosomas, que quedan retenidos en la maquinaria de traducción durante la producción de los extractos. Estos mRNAs están sometidos a procesos de reiniciación de la traducción de los ribosomas. Éste es un proceso que se potencia por la conformación circular del mRNA, llevada a cabo por la interacción simultánea del *cap* y la cola de poli(A) con eIF4G, por mediación de eIF4E y PABP (Kahvejian, A. y col., 2001). Por tanto, la hidrólisis de eIF4G y PABP podría romper esta conformación con la consecuente inhibición del reciclado de los ribosomas. HIV-1 PR inhibe la traducción de mRNAs con *cap* en todos los extractos celulares testados. Además, esta proteasa es capaz de bloquear específicamente la traducción dependiente

de la cola de poli(A) en extractos con sinergismo *cap*-poli(A), pero no tiene efecto en la de la traducción de mRNAs sin ninguna de las dos estructuras. En conclusión, HIV-1 PR impide la iniciación de la traducción dirigida por el *cap* y por la cola de poli(A).

Kahvejian y col. describieron que una PABP truncada purificada, que sólo contiene el NTD, es suficiente para rescatar la traducción dependiente de cola de poli(A) en extractos de células Krebs-2 depletados de PABP (Kahvejian, A. y col., 2005). De hecho, el NTD de PABP posee los dominios necesarios para dar la conformación circular al mRNA: los RRM3 y el dominio de interacción con eIF4G. Sin embargo, la liberación del CTD por 3C^{pro} del PV o por HIV-1 PR podría reducir la disponibilidad de los factores eIF4B o eRF3. Además, la pérdida del CTD podría inhibir la oligomerización de la PABP sobre la cola de poli(A). Sin embargo, HIV-1 PR y HIV-2 PR realizan un corte adicional en el RRM3, dando lugar a un producto que contiene los RRM1 y 2. La adición de una PABP truncada, que sólo contiene estos dos RRM3 a extractos sin PABP no logra recuperar la traducción dependiente de la cola de poli(A) (Kahvejian, A. y col., 2005). Por tanto, HIV-1 PR y HIV-2 PR inactivan completamente a PABP para la traducción.

La cola de poli(A) estimula la traducción de los RNAs que contienen los IRES de picornavirus. Sin embargo, en las células infectadas con el PV se corta eIF4G y PABP (Gradi, A. y col., 1998b, Kuyumcu-Martinez, N.M. y col., 2002, Kuyumcu-Martinez, N.M. y col., 2004, Svitkin, Y.V. y col., 2001). El corte de eIF4GI y PABP mediado por HIV-1 PR estimula moderadamente la traducción dirigida por el IRES del EMCV en extractos de células HeLa y Krebs-2. Sin embargo, esta estimulación no es comparable en magnitud con la que induce MBP-2A^{pro} al hidrolizar eIF4GI y eIF4GII. De hecho, la estimulación de la traducción dirigida por el IRES del EMCV inducida por HIV-1 PR es suficiente para contrarrestar la pérdida de la traducción dependiente de cola de poli(A) en extractos de células HeLa, pero no de Krebs-2. Las diferencias entre las dos proteasas en su capacidad para estimular la traducción interna pueden ser debidas a: i) Que se requiera la hidrólisis de eIF4GI y eIF4GII para obtener una estimulación óptima. Sin embargo, en extractos de células Krebs-2 tratadas con HIV-1 PR y MBP-2A^{pro} simultáneamente no se produjo ninguna estimulación adicional de la traducción, en comparación con los extractos tratados solamente con HIV-1 PR. ii) HIV-1 PR corta eficazmente PABP, mientras que MBP-2A^{pro} lo hace de manera muy ineficaz. Sin embargo, las diferencias en la capacidad de las dos proteasas para estimular la traducción dirigida por el IRES se mantienen aunque el mRNA no disponga de cola de poli(A), caso en el que no participa PABP. iii) Ambas proteasas cortan de manera distinta eIF4GI. Mientras que 2A^{pro} proteoliza eIF4GI en una única posición (681), HIV-1 PR corta en dos sitios alejados (posiciones 718-721 y 1125), dando lugar a tres productos de corte. Así, el producto C-t producido por 2A^{pro} podría soportar la traducción dirigida por el IRES del EMCV de forma más eficaz que el producto central producido por HIV-1 PR. iv) Por último, una posibilidad

propuesta por Zhang y col. es que el producto CTD de PABP producido por 3C^{pro} del HAV interfiere con la traducción interna (Zhang, B. y col., 2007). Esto podría ser también aplicado para HIV-1, puesto que el CTD generado es similar. Sin embargo, la traducción dirigida por el IRES del HAV es inhibida con el corte de eIF4G, en contra de lo que ocurre con el del EMCV (Ali, I.K. y col., 2001, Borman, A.M. y col., 2001).

4.4. Efecto de la hidrólisis de eIF4GI, eIF4GII Y PABP en la traducción de los RNAs del SV.

La mayoría de los mRNAs tardíos de los virus citolíticos se traducen cuando la síntesis de proteínas celulares está inhibida (Schneider, R.J. y Mohr, I., 2003). Este es el caso del mRNA subgenómico o 26S del SV. Este mRNA dispone de diversas secuencias que le confieren una gran traducibilidad en condiciones adversas para los mRNAs celulares: la secuencia líder 26S y los 226 primeros nts de la secuencia de C (Frolov, I. y Schlesinger, S., 1994;1996, Ventoso, I. y col., 2006). La secuencia líder 26S del virus del bosque Semliki (SFV), otro alfavirus, confiere a mRNAs quiméricos la capacidad de ser traducidos en presencia de bajas cantidades de eIFs (Berben-Bloemhevel, G. y col., 1992). Tal y como se infiere de nuestros resultados con el SV-GFP, la secuencia líder 26S del SV es capaz de dirigir la traducción en condiciones en las que el virus ha inhibido la síntesis de proteínas celulares. Por otro lado, los mRNAs subgenómicos que contienen los primeros 226 nt de la secuencia de C se traducen 5-10 veces más eficazmente que los que carecen de ella (Frolov, I. y Schlesinger, S., 1994;1996). Esto se debe a que los 170 primeros nt de la secuencia de C se aparean en una serie de horquillas, que podrían reclutar eIFs presentes en bajas concentraciones. Alternativamente, se ha propuesto que esta estructura podría detener *el scanning* de la subunidad 40S del ribosoma en el AUG iniciador (Frolov, I. y Schlesinger, S., 1996).

Nuestros resultados muestran que el mRNAs subgenómico del SV se traduce aunque eIF4G y PABP hayan sido hidrolizados por 2A^{pro} o HIV-1 PR. Por tanto, este mRNA viral puede reclutar la maquinaria de síntesis de proteínas sin mediación de eIF4E y PABP. En cambio, la traducción del RNA genómico del SV se inhibe cuando eIF4G está cortado, comportándose como un mRNAs celular. Un dato interesante es que cuando eIF4G ha sido hidrolizado justo antes de la etapa tardía de la infección GFP se expresa con normalidad en las células infectadas con el SV-GFP, tal y como ocurre con las proteínas estructurales del virus. Este resultado sugiere que la secuencia líder 26S es suficiente para que un mRNA reclute la maquinaria de traducción de forma independiente de eIF4E y PABP. Lo más relevante de este hallazgo radica en el hecho de que esta secuencia sólo dispone de 49 nt y carece de estructura secundaria (Frolov, I. y Schlesinger, S., 1996, Ventoso, I. y col., 2006). Los experimentos con los mutantes que poseen deleciones de la secuencia líder 26S del mRNA subgenómico duplicado del SV-GFP demuestran que no se requiere los nts del 11 al 49 para que este mRNA

se traduzca de manera no canónica. Sin embargo, la ausencia de los nucleótidos 11-31 producen un descenso en la expresión de GFP, posiblemente debido a un problema en la transcripción (Levis, R. y col., 1990). Además, la sustitución en el SV de la secuencia líder 26S por la de la luciferasa inhibe severamente la traducción del mRNA subgenómico (datos no publicados). Es posible que la carencia de estructura secundaria de esta 5'UTR facilite la traducción de este mRNA. De hecho, el VSV produce mRNAs que poseen secuencias líderes cortas y sin estructura secundaria de entre 11 y 49 nts, de modo que estos mRNAs pueden ser traducidos en la infección a pesar de que se inactive eIF4E (Connor, J.H. y Lyles, D.S., 2002). Otro caso es el de los mRNAs de adenovirus que contienen la secuencia tripartita. Estos mRNAs se traducen de manera *cap*-independiente por la presencia de una secuencia líder sin estructura secundaria (Dolph, P.J. y col., 1988, Thomas, A.A. y col., 1992).

Los mRNAs subgenómicos del SV no se traducen por iniciación interna (Ventoso, I. y col., 2006). No obstante, inician su traducción cuando eIF2 α está fosforilado por la proteína quinasa activada por RNA (PKR) (Gorchakov, R. y col., 2004). Este asombroso resultado se debe a que la estructura en horquilla situada en la secuencia de C le permite emplear un homólogo del eIF2 α , el eIF2a, para introducir el Met-tRNA_i (Ventoso, I. y col., 2006). En conclusión, tanto la secuencia líder 26S como las horquillas en la secuencia de C contribuyen para que la traducción del mRNA subgenómico del SV posea unos requerimientos de eIFs muy inferiores a los mRNAs celulares. El hecho de que en nuestro sistema los mRNAs sin la secuencia de C se traduzcan eficazmente durante la infección con el SV se debe a que en las células BHK la actividad de la PKR no es tan potente como en otras líneas celulares (Dato no mostrado).

Por último, la traducción de mRNAs transcritos *in vitro* que poseen la secuencia líder 26S más la secuencia de C se inhibe cuando eIF4G está cortado en células no infectadas. Este resultado implica que la traducción en condiciones de déficit de eIFs requiere de algún factor producido o alterado por la infección. Una posibilidad sugerente es que una proteína del SV interactúe con los primeros 11 nt de la secuencia líder 26S para reclutar la maquinaria de síntesis de proteínas, haciendo las veces de un eIF viral. Esta posibilidad ya ha sido sugerida para ciertas proteínas virales como NS1 y PB2 del IV (Aragon, T. y col., 2000, Burgui, I. y col., 2003, Burgui, I. y col., 2007), NSP3A de rotavirus (Piron, M. y col., 1998), o VPg del Norwalk virus (Daughenbaugh, K.F. y col., 2003). Uno de los futuros objetivos de nuestro laboratorio consistirá en determinar si ciertamente alguna proteína del SV participa en la síntesis de proteínas como un eIF específico para los mRNAs tardíos del virus.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. El corte de eIF4GI y eIF4GII es suficiente para inhibir completamente la síntesis de proteínas, no requiriéndose la hidrólisis adicional de PABP. La hidrólisis de eIF4G inhibe tanto la iniciación de la traducción dependiente del *cap* como de la cola de poli(A), rompiendo el sinergismo traduccional entre las dos estructuras.
2. Mientras que el corte de eIF4GI correlaciona con la inhibición de la expresión de los mRNAs de luciferasa sintetizados *de novo*, el corte de eIF4GII coincide con la inhibición de la traducción de los mRNAs pre-existentes. Además, el corte de eIF4GI no impide la reasociación de los mRNAs con los ribosomas tras un choque hipertónico.
3. La traducción del mRNA de estrés Hsp70 se inhibe parcialmente por el corte de eIF4GI y eIF4GII. Además, el corte de estos factores por 2A^{pro} estimula *in vitro* y en células en cultivo la traducción dirigida por los IRES de picornavirus, contrarrestando la inhibición de la traducción dependiente de la cola de poli(A).
4. La depleción de eIF4GI o eIF4GII mediante el uso de siRNAs sólo produce una disminución parcial en la síntesis de proteínas y en la división celular. Estos efectos se incrementan cuando se depletan simultáneamente ambos factores.
5. La proteasa 2A del PV inhibe el transporte de RNAs desde el núcleo, incluyendo diversos mRNAs, el rRNA 18S y el U2 snRNA. El producto C-t de eIF4GI queda retenido en el núcleo. Sin embargo, la depleción de eIF4GI en las células no inhibe la exportación de RNAs.
6. La proteasa 2A del PV inhibe el *splicing* de los pre-mRNAs de Fas y MinK *in vitro* y en células en cultivo, respectivamente, afectándose la liberación del intrón por su extremo 3'.
7. La infección por HIV induce el corte proteolítico de eIF4GI y PABP en células MT-2. La proteólisis de PABP es mediada por HIV-1 PR y ocurre con otras proteasas de retrovirus como HIV-2 PR y MMTV PR. La proteólisis de PABP por HIV-1 PR es directa y se produce en las posiciones 237 y 477.

8. HIV-1 PR inhibe la traducción dependiente de *cap* y de cola de poli(A). Además, ambas proteasas rompen el sinergismo *cap*/poli(A) en traducción, pero no impide la iniciación interna de mediada por los IRES de picornavirus. Por tanto, la combinación del corte de eIF4GI y eIF4GII o eIF4GI y PABP son dos estrategias eficaces para inhibir la síntesis de proteínas.

9. El mRNA subgenómico del SV inicia su traducción sin mediación de eIF4E y PABP en las células infectadas. La secuencia líder del mRNA subgenómico del SV, y en concreto sus 11 primeros nucleótidos, es la responsable de este fenómeno. No obstante, el mRNA subgenómico del SV se comporta de manera *cap*-independiente en células infectadas y *cap*-dependiente en células no infectadas.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

Adam, S.A., Nakagawa, T., Swanson, M.S., Woodruff, T.K. y Dreyfuss, G. (1986). mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. *Mol. Cell Biol.* **6**(8), 2932-43.

Aldabe, R. (1995). "Modificaciones celulares inducidas por proteínas del virus de la polio ". Tesis Doctoral: Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.

Aldabe, R., Feduchi, E., Novoa, I. y Carrasco, L. (1995a). Expression of poliovirus 2Apro in mammalian cells: effects on translation. *FEBS Lett.* **377**(1), 1-5.

Aldabe, R., Feduchi, E., Novoa, I. y Carrasco, L. (1995b). Efficient cleavage of p220 by poliovirus 2Apro expression in mammalian cells: effects on vaccinia virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**(3), 928-36.

Ali, I.K., McKendrick, L., Morley, S.J. y Jackson, R.J. (2001). Activity of the hepatitis A virus IRES requires association between the cap-binding translation initiation factor (eIF4E) and eIF4G. *J. Virol.* **75**(17), 7854-63.

Almstead, L.L. y Sarnow, P. (2007). Inhibition of U snRNP assembly by a virus-encoded proteinase. *Genes Dev.* **21**(9), 1086-97.

Altmann, M., Muller, P.P., Wittmer, B., Ruchti, F., Lanker, S. y Trachsel, H. (1993). A *Saccharomyces cerevisiae* homologue of mammalian translation initiation factor 4B contributes to RNA helicase activity. *EMBO J.* **12**(10), 3997-4003.

Alvarez, E., Menendez-Arias, L. y Carrasco, L. (2003). The eukaryotic translation initiation factor 4GI is cleaved by different retroviral proteases. *J. Virol.* **77**(23), 12392-400.

Álvarez, E. (2004). "Modificación de la maquinaria de iniciación de la traducción por proteasas retrovirales." Tesis Doctoral: Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.

Apriletti, J.W. y Penhoet, E.E. (1978). Cellular RNA synthesis in normal and mengovirus-infected L-929 cells. *J. Biol. Chem.* **253**(2), 603-11.

Aragon, T., de la Luna, S., Novoa, I., Carrasco, L., Ortin, J. y Nieto, A. (2000). Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol. Cell Biol.* **20**(17), 6259-68.

Asano, K., Clayton, J., Shalev, A. y Hinnebusch, A.G. (2000). A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes Dev.* **14**(19), 2534-46.

Asano, K., Phan, L., Valasek, L., Schoenfeld, L.W., Shalev, A., Clayton, J., Nielsen, K., Donahue, T.F. y Hinnebusch, A.G. (2001a). A multifactor complex of eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and tRNA(i)Met promotes initiation complex assembly and couples GTP hydrolysis to AUG recognition. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **66**, 403-15.

Asano, K., Shalev, A., Phan, L., Nielsen, K., Clayton, J., Valasek, L., Donahue, T.F. y Hinnebusch, A.G. (2001b). Multiple roles for the C-terminal domain of eIF5 in translation initiation complex assembly and GTPase activation. *EMBO J.* **20**(9), 2326-37.

- Back, S.H., Kim, Y.K., Kim, W.J., Cho, S., Oh, H.R., Kim, J.E. y Jang, S.K.** (2002). Translation of polioviral mRNA is inhibited by cleavage of polypyrimidine tract-binding proteins executed by polioviral 3C(pro). *J. Virol.* **76**(5), 2529-42.
- Banerjee, R., Weidman, M.K., Navarro, S., Comai, L. y Dasgupta, A.** (2005). Modifications of both selectivity factor and upstream binding factor contribute to poliovirus-mediated inhibition of RNA polymerase I transcription. *J. Gen. Virol.* **86**(Pt 8), 2315-22.
- Barco, A., Feduchi, E. y Carrasco, L.** (2000). A stable HeLa cell line that inducibly expresses poliovirus 2A(pro): effects on cellular and viral gene expression. *J. Virol.* **74**(5), 2383-92.
- Belov, G.A., Lidsky, P.V., Mikitas, O.V., Egger, D., Lukyanov, K.A., Bienz, K. y Agol, V.I.** (2004). Bidirectional increase in permeability of nuclear envelope upon poliovirus infection and accompanying alterations of nuclear pores. *J. Virol.* **78**(18), 10166-77.
- Belsham, G.J., McInerney, G.M. y Ross-Smith, N.** (2000). Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells. *J. Virol.* **74**(1), 272-80.
- Berben-Bloemhevel, G., Kasperaitis, M.A., van Heugten, H., Thomas, A.A., van Steeg, H. y Voorma, H.O.** (1992). Interaction of initiation factors with the cap structure of chimaeric mRNA containing the 5'-untranslated regions of Semliki Forest virus RNA is related to translational efficiency. *Eur. J. Biochem.* **208**(3), 581-7.
- Berger, A. y Schechter, I.** (1970). Mapping the active site of papain with the aid of peptide substrates and inhibitors. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **257**(813), 249-64.
- Bick, M.J., Carroll, J.W., Gao, G., Goff, S.P., Rice, C.M. y MacDonald, M.R.** (2003). Expression of the zinc-finger antiviral protein inhibits alphavirus replication. *J. Virol.* **77**(21), 11555-62.
- Bonneau, A.M. y Sonenberg, N.** (1987). Proteolysis of the p220 component of the cap-binding protein complex is not sufficient for complete inhibition of host cell protein synthesis after poliovirus infection. *J. Virol.* **61**(4), 986-91.
- Borman, A.M., Kirchweger, R., Ziegler, E., Rhoads, R.E., Skern, T. y Kean, K.M.** (1997). eIF4G and its proteolytic cleavage products: effect on initiation of protein synthesis from capped, uncapped, and IRES-containing mRNAs. *RNA* **3**(2), 186-96.
- Borman, A.M., Michel, Y.M. y Kean, K.M.** (2001). Detailed analysis of the requirements of hepatitis A virus internal ribosome entry segment for the eukaryotic initiation factor complex eIF4F. *J. Virol.* **75**(17), 7864-71.
- Bovee, M.L., Lamphear, B.J., Rhoads, R.E. y Lloyd, R.E.** (1998). Direct cleavage of eIF4G by poliovirus 2A protease is inefficient in vitro. *Virology* **245**(2), 241-9.
- Bradrick, S.S., Dobrikova, E.Y., Kaiser, C., Shveygert, M. y Gromeier, M.** (2007). Poly(A)-binding protein is differentially required for translation mediated by viral internal ribosome entry sites. *RNA* **13**(9), 1582-93.
- Browning, K.S.** (1996). The plant translational apparatus. *Plant Mol. Biol.* **32**(1-2), 107-44.
- Burd, C.G., Matunis, E.L. y Dreyfuss, G.** (1991). The multiple RNA-binding domains of the mRNA poly(A)-binding protein have different RNA-binding activities. *Mol. Cell Biol.* **11**(7), 3419-24.

- Burgui, I., Aragon, T., Ortin, J. y Nieto, A.** (2003). PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J. Gen. Virol.* **84**(Pt 12), 3263-74.
- Burgui, I., Yanguéz, E., Sonenberg, N. y Nieto, A.** (2007). Influenza virus mRNA translation revisited: is the eIF4E cap-binding factor required for viral mRNA translation? *J. Virol.* **81**(22), 12427-38.
- Bushell, M., Poncet, D., Marissen, W.E., Flotow, H., Lloyd, R.E., Clemens, M.J. y Morley, S.J.** (2000). Cleavage of polypeptide chain initiation factor eIF4GI during apoptosis in lymphoma cells: characterisation of an internal fragment generated by caspase-3-mediated cleavage. *Cell Death Differ.* **7**(7), 628-36.
- Byrd, M.P., Zamora, M. y Lloyd, R.E.** (2005). Translation of eukaryotic translation initiation factor 4GI (eIF4GI) proceeds from multiple mRNAs containing a novel cap-dependent internal ribosome entry site (IRES) that is active during poliovirus infection. *J. Biol. Chem.* **280**(19), 18610-22.
- Calandria, C., Irurzun, A., Barco, A. y Carrasco, L.** (2004). Individual expression of poliovirus 2Apro and 3Cpro induces activation of caspase-3 and PARP cleavage in HeLa cells. *Virus Res.* **104**(1), 39-49.
- Caron, S., Charon, M., Cramer, E., Sonenberg, N. y Dusanter-Fourt, I.** (2004). Selective modification of eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F) at the onset of cell differentiation: recruitment of eIF4GII and long-lasting phosphorylation of eIF4E. *Mol. Cell Biol.* **24**(11), 4920-8.
- Castello, A., Alvarez, E. y Carrasco, L.** (2006a). Differential cleavage of eIF4GI and eIF4GII in mammalian cells. Effects on translation. *J. Biol. Chem.* **281**(44), 33206-16.
- Castello, A., Sanz, M.A., Molina, S. y Carrasco, L.** (2006b). Translation of Sindbis virus 26S mRNA does not require intact eukaryotic initiation factor 4G. *J. Mol. Biol.* **355**(5), 942-56.
- Castrillo, J.L.** (1986). "Estudio de la interferencia viral en células infectadas con picornavirus: regulación de la síntesis de proteínas." Tesis Doctoral: Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Coldwell, M.J., Hashemzadeh-Bonehi, L., Hinton, T.M., Morley, S.J. y Pain, V.M.** (2004). Expression of fragments of translation initiation factor eIF4GI reveals a nuclear localisation signal within the N-terminal apoptotic cleavage fragment N-FAG. *J. Cell Sci.* **117**(Pt 12), 2545-55.
- Coldwell, M.J. y Morley, S.J.** (2006). Specific isoforms of translation initiation factor 4GI show differences in translational activity. *Mol. Cell Biol.* **26**(22), 8448-60.
- Connor, J.H. y Lyles, D.S.** (2002). Vesicular stomatitis virus infection alters the eIF4F translation initiation complex and causes dephosphorylation of the eIF4E binding protein 4E-BP1. *J. Virol.* **76**(20), 10177-87.
- Cosson, B., Berkova, N., Couturier, A., Chabelskaya, S., Philippe, M. y Zhouravleva, G.** (2002). Poly(A)-binding protein and eRF3 are associated in vivo in human and *Xenopus* cells. *Biol. Cell* **94**(4-5), 205-16.

- Craig, A.W., Haghighat, A., Yu, A.T. y Sonenberg, N.** (1998). Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* **392**(6675), 520-3.
- Cuconati, A., Molla, A. y Wimmer, E.** (1998). Brefeldin A inhibits cell-free, de novo synthesis of poliovirus. *J. Virol.* **72**(8), 6456-64.
- Cuesta, R., Laroia, G. y Schneider, R.J.** (2000). Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes Dev.* **14**(12), 1460-70.
- Culjkovic, B., Topisirovic, I., Skrabanek, L., Ruiz-Gutierrez, M. y Borden, K.L.** (2006). eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. *J. Cell Biol.* **175**(3), 415-26.
- Cullen, B.R.** (2000). Nuclear RNA export pathways. *Mol. Cell Biol.* **20**(12), 4181-7.
- Cullen, B.R.** (2003). Nuclear RNA export. *J. Cell Sci.* **116**(Pt 4), 587-97.
- Chakrabarti, A. y Maitra, U.** (1991). Function of eukaryotic initiation factor 5 in the formation of an 80 S ribosomal polypeptide chain initiation complex. *J. Biol. Chem.* **266**(21), 14039-45.
- Cheng, H., Dufu, K., Lee, C.S., Hsu, J.L., Dias, A. y Reed, R.** (2006). Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell* **127**(7), 1389-400.
- Daughenbaugh, K.F., Fraser, C.S., Hershey, J.W. y Hardy, M.E.** (2003). The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J.* **22**(11), 2852-9.
- De Gregorio, E., Preiss, T. y Hentze, M.W.** (1998). Translational activation of uncapped mRNAs by the central part of human eIF4G is 5' end-dependent. *RNA* **4**(7), 828-36.
- De Gregorio, E., Preiss, T. y Hentze, M.W.** (1999). Translation driven by an eIF4G core domain in vivo. *EMBO J.* **18**(17), 4865-74.
- Deo, R.C., Bonanno, J.B., Sonenberg, N. y Burley, S.K.** (1999). Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell* **98**(6), 835-45.
- Devaney, M.A., Vakharia, V.N., Lloyd, R.E., Ehrenfeld, E. y Grubman, M.J.** (1988). Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J. Virol.* **62**(11), 4407-9.
- Dolph, P.J., Racaniello, V., Villamarin, A., Palladino, F. y Schneider, R.J.** (1988). The adenovirus tripartite leader may eliminate the requirement for cap-binding protein complex during translation initiation. *J. Virol.* **62**(6), 2059-66.
- Dreyfuss, G., Swanson, M.S. y Pinol-Roma, S.** (1988). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. *Trends Biochem. Sci.* **13**(3), 86-91.
- Dulbecco, R. y Freeman, G.** (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology* **8**(3), 396-7.

- Etchison, D., Milburn, S.C., Edery, I., Sonenberg, N. y Hershey, J.W.** (1982). Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *J. Biol. Chem.* **257**(24), 14806-10.
- Etchison, D. y Smith, K.** (1990). Variations in cap-binding complexes from uninfected and poliovirus-infected HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **265**(13), 7492-500.
- Faleiro, L. y Lazebnik, Y.** (2000). Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *J. Cell Biol.* **151**(5), 951-9.
- Faria, P.A., Chakraborty, P., Levay, A., Barber, G.N., Ezelle, H.J., Enninga, J., Arana, C., van Deursen, J. y Fontoura, B.M.** (2005). VSV disrupts the Rae1/mrnp41 mRNA nuclear export pathway. *Mol. Cell* **17**(1), 93-102.
- Fontoura, B.M., Faria, P.A. y Nussenzweig, D.R.** (2005). Viral interactions with the nuclear transport machinery: discovering and disrupting pathways. *IUBMB Life* **57**(2), 65-72.
- Forch, P., Puig, O., Kedersha, N., Martinez, C., Granneman, S., Seraphin, B., Anderson, P. y Valcarcel, J.** (2000). The apoptosis-promoting factor TIA-1 is a regulator of alternative pre-mRNA splicing. *Mol. Cell* **6**(5), 1089-98.
- Fortes, P., Beloso, A. y Ortin, J.** (1994). Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *EMBO J.* **13**(3), 704-12.
- Fortes, P., Kufel, J., Fornerod, M., Polycarpou-Schwarz, M., Lafontaine, D., Tollervey, D. y Mattaj, I.W.** (1999). Genetic and physical interactions involving the yeast nuclear cap-binding complex. *Mol. Cell Biol.* **19**(10), 6543-53.
- Franco, D., Pathak, H.B., Cameron, C.E., Rombaut, B., Wimmer, E. y Paul, A.V.** (2005a). Stimulation of poliovirus RNA synthesis and virus maturation in a HeLa cell-free in vitro translation-RNA replication system by viral protein 3CDpro. *Viol. J.* **2**, 86.
- Franco, D., Pathak, H.B., Cameron, C.E., Rombaut, B., Wimmer, E. y Paul, A.V.** (2005b). Stimulation of poliovirus synthesis in a HeLa cell-free in vitro translation-RNA replication system by viral protein 3CDpro. *J. Virol.* **79**(10), 6358-67.
- Frolov, I. y Schlesinger, S.** (1994). Translation of Sindbis virus mRNA: effects of sequences downstream of the initiating codon. *J. Virol.* **68**(12), 8111-7.
- Frolov, I. y Schlesinger, S.** (1996). Translation of Sindbis virus mRNA: analysis of sequences downstream of the initiating AUG codon that enhance translation. *J. Virol.* **70**(2), 1182-90.
- Fukuchi-Shimogori, T., Ishii, I., Kashiwagi, K., Mashiba, H., Ekimoto, H. y Igarashi, K.** (1997). Malignant transformation by overproduction of translation initiation factor eIF4G. *Cancer Res.* **57**(22), 5041-4.
- Gallie, D.R.** (1998). A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene* **216**(1), 1-11.
- Gingras, A.C., Raught, B. y Sonenberg, N.** (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 913-63.

- Goke, A., Goke, R., Knolle, A., Trusheim, H., Schmidt, H., Wilmen, A., Carmody, R., Goke, B. y Chen, Y.H.** (2002). DUG is a novel homologue of translation initiation factor 4G that binds eIF4A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**(1), 78-82.
- Goldstaub, D., Gradi, A., Bercovitch, Z., Grosmann, Z., Nophar, Y., Luria, S., Sonenberg, N. y Kahana, C.** (2000). Poliovirus 2A protease induces apoptotic cell death. *Mol. Cell Biol.* **20**(4), 1271-7.
- Gorchakov, R., Frolova, E., Williams, B.R., Rice, C.M. y Frolov, I.** (2004). PKR-dependent and -independent mechanisms are involved in translational shutoff during Sindbis virus infection. *J. Virol.* **78**(16), 8455-67.
- Gossen, M. y Bujard, H.** (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**(12), 5547-51.
- Goyer, C., Altmann, M., Lee, H.S., Blanc, A., Deshmukh, M., Woolford, J.L., Jr., Trachsel, H. y Sonenberg, N.** (1993). TIF4631 and TIF4632: two yeast genes encoding the high-molecular-weight subunits of the cap-binding protein complex (eukaryotic initiation factor 4F) contain an RNA recognition motif-like sequence and carry out an essential function. *Mol. Cell Biol.* **13**(8), 4860-74.
- Gradi, A., Imataka, H., Svitkin, Y.V., Rom, E., Raught, B., Morino, S. y Sonenberg, N.** (1998a). A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol. Cell Biol.* **18**(1), 334-42.
- Gradi, A., Svitkin, Y.V., Imataka, H. y Sonenberg, N.** (1998b). Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**(19), 11089-94.
- Gradi, A., Foeger, N., Strong, R., Svitkin, Y.V., Sonenberg, N., Skern, T. y Belsham, G.J.** (2004). Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4GII within foot-and-mouth disease virus-infected cells: identification of the L-protease cleavage site in vitro. *J. Virol.* **78**(7), 3271-8.
- Gross, J.D., Moerke, N.J., von der Haar, T., Lugovskoy, A.A., Sachs, A.B., McCarthy, J.E. y Wagner, G.** (2003). Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* **115**(6), 739-50.
- Gustin, K.E. y Sarnow, P.** (2001). Effects of poliovirus infection on nucleo-cytoplasmic trafficking and nuclear pore complex composition. *EMBO J.* **20**(1-2), 240-9.
- Gustin, K.E. y Sarnow, P.** (2002). Inhibition of nuclear import and alteration of nuclear pore complex composition by rhinovirus. *J. Virol.* **76**(17), 8787-96.
- Haghighat, A., Svitkin, Y., Novoa, I., Kuechler, E., Skern, T. y Sonenberg, N.** (1996). The eIF4G-eIF4E complex is the target for direct cleavage by the rhinovirus 2A proteinase. *J. Virol.* **70**(12), 8444-50.
- Hahn, C.S., Hahn, Y.S., Braciale, T.J. y Rice, C.M.** (1992). Infectious Sindbis virus transient expression vectors for studying antigen processing and presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**(7), 2679-83.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**(4), 557-80.

- Hannig, E.M.** (1995). Protein synthesis in eukaryotic organisms: new insights into the function of translation initiation factor eIF-3. *Bioessays* **17**(11), 915-9.
- Harlow, E. y Lane, D.** (1988). "Antibodies. A laboratory manual." (N. Y. Cold Spring Harbor Press, Ed.), NY.
- Hellen, C.U., Lee, C.K. y Wimmer, E.** (1992). Determinants of substrate recognition by poliovirus 2A proteinase. *J. Virol.* **66**(6), 3330-8.
- Henis-Korenblit, S., Strumpf, N.L., Goldstaub, D. y Kimchi, A.** (2000). A novel form of DAP5 protein accumulates in apoptotic cells as a result of caspase cleavage and internal ribosome entry site-mediated translation. *Mol. Cell Biol.* **20**(2), 496-506.
- Henis-Korenblit, S., Shani, G., Sines, T., Marash, L., Shohat, G. y Kimchi, A.** (2002). The caspase-cleaved DAP5 protein supports internal ribosome entry site-mediated translation of death proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**(8), 5400-5.
- Herold, J. y Andino, R.** (2001). Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol. Cell* **7**(3), 581-91.
- Hinnebusch, A.G.** (2006). eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem. Sci.* **31**(10), 553-62.
- Huang, H.K., Yoon, H., Hannig, E.M. y Donahue, T.F.** (1997). GTP hydrolysis controls stringent selection of the AUG start codon during translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **11**(18), 2396-413.
- Hundsdoerfer, P., Thoma, C. y Hentze, M.W.** (2005). Eukaryotic translation initiation factor 4GI and p97 promote cellular internal ribosome entry sequence-driven translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**(38), 13421-6.
- Imataka, H., Olsen, H.S. y Sonenberg, N.** (1997). A new translational regulator with homology to eukaryotic translation initiation factor 4G. *EMBO J.* **16**(4), 817-25.
- Imataka, H. y Sonenberg, N.** (1997). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Mol. Cell Biol.* **17**(12), 6940-7.
- Imataka, H., Gradi, A. y Sonenberg, N.** (1998). A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J.* **17**(24), 7480-9.
- Irurzun, A., Sanchez-Palomino, S., Novoa, I. y Carrasco, L.** (1995). Monensin and nigericin prevent the inhibition of host translation by poliovirus, without affecting p220 cleavage. *J. Virol.* **69**(12), 7453-60.
- Izquierdo, J.M., Majos, N., Bonnal, S., Martinez, C., Castelo, R., Guigo, R., Bilbao, D. y Valcarcel, J.** (2005). Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition. *Mol. Cell* **19**(4), 475-84.
- Joachims, M., Van Breugel, P.C. y Lloyd, R.E.** (1999). Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. *J. Virol.* **73**(1), 718-27.

- Kahvejian, A., Roy, G. y Sonenberg, N.** (2001). The mRNA closed-loop model: the function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **66**, 293-300.
- Kahvejian, A., Svitkin, Y.V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M.N. y Sonenberg, N.** (2005). Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev.* **19**(1), 104-13.
- Kedersha, N. y Anderson, P.** (2007). Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol.* **431**, 61-81.
- Keiper, B.D. y Rhoads, R.E.** (1997). Cap-independent translation initiation in *Xenopus* oocytes. *Nucleic Acids Res.* **25**(2), 395-402.
- Keiper, B.D. y Rhoads, R.E.** (1999). Translational recruitment of *Xenopus* maternal mRNAs in response to poly(A) elongation requires initiation factor eIF4G-1. *Dev. Biol.* **206**(1), 1-14.
- Khaleghpour, K., Kahvejian, A., De Crescenzo, G., Roy, G., Svitkin, Y.V., Imataka, H., O'Connor-McCourt, M. y Sonenberg, N.** (2001a). Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Mol. Cell Biol.* **21**(15), 5200-13.
- Khaleghpour, K., Svitkin, Y.V., Craig, A.W., DeMaria, C.T., Deo, R.C., Burley, S.K. y Sonenberg, N.** (2001b). Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. *Mol. Cell* **7**(1), 205-16.
- Kolupaeva, V.G., Hellen, C.U. y Shatsky, I.N.** (1996). Structural analysis of the interaction of the pyrimidine tract-binding protein with the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and foot-and-mouth disease virus RNAs. *RNA* **2**(12), 1199-212.
- Korneeva, N.L., Lamphear, B.J., Hennigan, F.L. y Rhoads, R.E.** (2000). Mutually cooperative binding of eukaryotic translation initiation factor (eIF) 3 and eIF4A to human eIF4G-1. *J. Biol. Chem.* **275**(52), 41369-76.
- Kozak, M.** (1989). The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.* **108**(2), 229-41.
- Kozlov, G., Trempe, J.F., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., Ekiel, I. y Gehring, K.** (2001). Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**(8), 4409-13.
- Krausslich, H.G., Nicklin, M.J., Toyoda, H., Etchison, D. y Wimmer, E.** (1987). Poliovirus proteinase 2A induces cleavage of eucaryotic initiation factor 4F polypeptide p220. *J. Virol.* **61**(9), 2711-8.
- Kuhn, U. y Pieler, T.** (1996). *Xenopus* poly(A) binding protein: functional domains in RNA binding and protein-protein interaction. *J. Mol. Biol.* **256**(1), 20-30.
- Kuyumcu-Martinez, M., Belliot, G., Sosnovtsev, S.V., Chang, K.O., Green, K.Y. y Lloyd, R.E.** (2004). Calicivirus 3C-like proteinase inhibits cellular translation by cleavage of poly(A)-binding protein. *J. Virol.* **78**(15), 8172-82.
- Kuyumcu-Martinez, N.M., Joachims, M. y Lloyd, R.E.** (2002). Efficient cleavage of ribosome-associated poly(A)-binding protein by enterovirus 3C protease. *J. Virol.* **76**(5), 2062-74.

- Kuyumcu-Martinez, N.M., Van Eden, M.E., Younan, P. y Lloyd, R.E.** (2004). Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff. *Mol. Cell Biol.* **24**(4), 1779-90.
- Lamphear, B.J., Yan, R., Yang, F., Waters, D., Liebig, H.D., Klump, H., Kuechler, E., Skern, T. y Rhoads, R.E.** (1993). Mapping the cleavage site in protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma of the 2A proteases from human Coxsackievirus and rhinovirus. *J. Biol. Chem.* **268**(26), 19200-3.
- Lamphear, B.J., Kirchweger, R., Skern, T. y Rhoads, R.E.** (1995). Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J. Biol. Chem.* **270**(37), 21975-83.
- Le, H., Tanguay, R.L., Balasta, M.L., Wei, C.C., Browning, K.S., Metz, A.M., Goss, D.J. y Gallie, D.R.** (1997). Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *J. Biol. Chem.* **272**(26), 16247-55.
- LeFebvre, A.K., Korneeva, N.L., Trutschl, M., Cvek, U., Duzan, R.D., Bradley, C.A., Hershey, J.W. y Rhoads, R.E.** (2006). Translation initiation factor eIF4G-1 binds to eIF3 through the eIF3e subunit. *J. Biol. Chem.* **281**(32), 22917-32.
- Lejeune, F., Ranganathan, A.C. y Maquat, L.E.** (2004). eIF4G is required for the pioneer round of translation in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**(10), 992-1000.
- Levis, R., Schlesinger, S. y Huang, H.V.** (1990). Promoter for Sindbis virus RNA-dependent subgenomic RNA transcription. *J. Virol.* **64**(4), 1726-33.
- Lewis, S.M., Cerquozzi, S., Graber, T.E., Ungureanu, N.H., Andrews, M. y Holcik, M.** (2007). The eIF4G homolog DAP5/p97 supports the translation of select mRNAs during endoplasmic reticulum stress. *Nucleic Acids Res.*
- Li, W., Belsham, G.J. y Proud, C.G.** (2001). Eukaryotic initiation factors 4A (eIF4A) and 4G (eIF4G) mutually interact in a 1:1 ratio in vivo. *J. Biol. Chem.* **276**(31), 29111-5.
- Lidsky, P.V., Hato, S., Bardina, M.V., Aminev, A.G., Palmenberg, A.C., Sheval, E.V., Polyakov, V.Y., van Kuppeveld, F.J. y Agol, V.I.** (2006). Nucleocytoplasmic traffic disorder induced by cardioviruses. *J. Virol.* **80**(6), 2705-17.
- Ling, J., Morley, S.J. y Traugh, J.A.** (2005). Inhibition of cap-dependent translation via phosphorylation of eIF4G by protein kinase Pak2. *EMBO J.* **24**(23), 4094-105.
- Loo, Y.M. y Gale, M., Jr.** (2007). Viral regulation and evasion of the host response. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **316**, 295-313.
- Luo, M.L., Zhou, Z., Magni, K., Christoforides, C., Rappsilber, J., Mann, M. y Reed, R.** (2001). Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly. *Nature* **413**(6856), 644-7.
- Lloyd, R.E., Grubman, M.J. y Ehrenfeld, E.** (1988). Relationship of p220 cleavage during picornavirus infection to 2A proteinase sequencing. *J. Virol.* **62**(11), 4216-23.
- Lloyd, R.E.** (2006). Translational control by viral proteinases. *Virus Res.* **119**(1), 76-88.

- Madan, M.V.** (2005). "Viroporinas de virus RNA." Tesis Doctoral: Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Mader, S., Lee, H., Pause, A. y Sonenberg, N.** (1995). The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol. Cell Biol.* **15**(9), 4990-7.
- Marissen, W.E., Gradi, A., Sonenberg, N. y Lloyd, R.E.** (2000a). Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4GII correlates with translation inhibition during apoptosis. *Cell Death Differ.* **7**(12), 1234-43.
- Marissen, W.E., Guo, Y., Thomas, A.A., Matts, R.L. y Lloyd, R.E.** (2000b). Identification of caspase 3-mediated cleavage and functional alteration of eukaryotic initiation factor 2alpha in apoptosis. *J. Biol. Chem.* **275**(13), 9314-23.
- Marissen, W.E., Triyoso, D., Younan, P. y Lloyd, R.E.** (2004). Degradation of poly(A)-binding protein in apoptotic cells and linkage to translation regulation. *Apoptosis* **9**(1), 67-75.
- Martinez-Salas, E. y Fernandez-Miragall, O.** (2004). Picornavirus IRES: structure function relationship. *Curr. Pharm. Des.* **10**(30), 3757-67.
- Matlin, A.J., Clark, F. y Smith, C.W.** (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nature reviews* **6**(5), 386-98.
- McKendrick, L., Thompson, E., Ferreira, J., Morley, S.J. y Lewis, J.D.** (2001). Interaction of eukaryotic translation initiation factor 4G with the nuclear cap-binding complex provides a link between nuclear and cytoplasmic functions of the m(7) guanosine cap. *Mol. Cell Biol.* **21**(11), 3632-41.
- Menendez-Arias, L., Gotte, D. y Oroszlan, S.** (1993). Moloney murine leukemia virus protease: bacterial expression and characterization of the purified enzyme. *Virology* **196**(2), 557-63.
- Michel, Y.M., Poncet, D., Piron, M., Kean, K.M. y Borman, A.M.** (2000). Cap-Poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts. Investigation of the requirements for poly(A)-mediated stimulation of translation initiation. *J. Biol. Chem.* **275**(41), 32268-76.
- Michel, Y.M., Borman, A.M., Paulous, S. y Kean, K.M.** (2001). Eukaryotic initiation factor 4G-poly(A) binding protein interaction is required for poly(A) tail-mediated stimulation of picornavirus internal ribosome entry segment-driven translation but not for X-mediated stimulation of hepatitis C virus translation. *Mol. Cell Biol.* **21**(13), 4097-109.
- Molla, A., Paul, A.V. y Wimmer, E.** (1991). Cell-free, de novo synthesis of poliovirus. *Science* **254**(5038), 1647-51.
- Morino, S., Imataka, H., Svitkin, Y.V., Pestova, T.V. y Sonenberg, N.** (2000). Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-third of eIF4GI constitute the core domain for cap-dependent translation, and the C-terminal one-third functions as a modulatory region. *Mol. Cell Biol.* **20**(2), 468-77.
- Munroe, D. y Jacobson, A.** (1990). mRNA poly(A) tail, a 3' enhancer of translational initiation. *Mol. Cell Biol.* **10**(7), 3441-55.
- Murray, K.E., Roberts, A.W. y Barton, D.J.** (2001). Poly(rC) binding proteins mediate poliovirus mRNA stability. *RNA* **7**(8), 1126-41.

- Naranda, T., Strong, W.B., Menaya, J., Fabbri, B.J. y Hershey, J.W.** (1994). Two structural domains of initiation factor eIF-4B are involved in binding to RNA. *J. Biol. Chem.* **269**(20), 14465-72.
- Nemeth, A., Krause, S., Blank, D., Jenny, A., Jenó, P., Lustig, A. y Wahle, E.** (1995). Isolation of genomic and cDNA clones encoding bovine poly(A) binding protein II. *Nucleic Acids Res.* **23**(20), 4034-41.
- Nevins, T.A., Harder, Z.M., Korneluk, R.G. y Holcik, M.** (2003). Distinct regulation of internal ribosome entry site-mediated translation following cellular stress is mediated by apoptotic fragments of eIF4G translation initiation factor family members eIF4GI and p97/DAP5/NAT1. *J. Biol. Chem.* **278**(6), 3572-9.
- Novoa, I.** (1996). "Efecto de la proteasa 2A del virus de la polio sobre la traducción de ARNm." Tesis Doctoral: Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Novoa, I., Martínez-Abarca, F., Fortes, P., Ortín, J. y Carrasco, L.** (1997). Cleavage of p220 by purified poliovirus 2A(pro) in cell-free systems: effects on translation of capped and uncapped mRNAs. *Biochemistry* **36**(25), 7802-9.
- Novoa, I. y Carrasco, L.** (1999). Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4G by exogenously added hybrid proteins containing poliovirus 2Apro in HeLa cells: effects on gene expression. *Mol. Cell Biol.* **19**(4), 2445-54.
- Oberer, M., Marintchev, A. y Wagner, G.** (2005). Structural basis for the enhancement of eIF4A helicase activity by eIF4G. *Genes Dev.* **19**(18), 2212-23.
- Ohlmann, T., Rau, M., Pain, V.M. y Morley, S.J.** (1996). The C-terminal domain of eukaryotic protein synthesis initiation factor (eIF) 4G is sufficient to support cap-independent translation in the absence of eIF4E. *EMBO J.* **15**(6), 1371-82.
- Ohlmann, T., Pain, V.M., Wood, W., Rau, M. y Morley, S.J.** (1997). The proteolytic cleavage of eukaryotic initiation factor (eIF) 4G is prevented by eIF4E binding protein (PHAS-I; 4E-BP1) in the reticulocyte lysate. *EMBO J.* **16**(4), 844-55.
- Ohlmann, T., Prevot, D., Decimo, D., Roux, F., Garin, J., Morley, S.J. y Darlix, J.L.** (2002). In vitro cleavage of eIF4GI but not eIF4GII by HIV-1 protease and its effects on translation in the rabbit reticulocyte lysate system. *J. Mol. Biol.* **318**(1), 9-20.
- Pain, V.M.** (1996). Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* **236**(3), 747-71.
- Perales, C., Carrasco, L. y Ventoso, I.** (2003). Cleavage of eIF4G by HIV-1 protease: effects on translation. *FEBS Lett.* **533**(1-3), 89-94.
- Perales, C., Carrasco, L. y Gonzalez, M.E.** (2005). Regulation of HIV-1 env mRNA translation by Rev protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1743**(1-2), 169-75.
- Perales, C.B.** (2002). "Regulación de la traducción de los ARNm de gag y env del virus de la inmunodeficiencia humana." Tesis Doctoral: Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Perez, L. y Carrasco, L.** (1992). Lack of direct correlation between p220 cleavage and the shut-off of host translation after poliovirus infection. *Virology* **189**(1), 178-86.

- Pestova, T.V., Borukhov, S.I. y Hellen, C.U.** (1998). Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* **394**(6696), 854-9.
- Pestova, T.V., Lomakin, I.B., Lee, J.H., Choi, S.K., Dever, T.E. y Hellen, C.U.** (2000). The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* **403**(6767), 332-5.
- Pestova, T.V. y Hellen, C.U.** (2001). Preparation and activity of synthetic unmodified mammalian tRNAⁱ(Met) in initiation of translation in vitro. *RNA* **7**(10), 1496-505.
- Pestova, T.V. y Hellen, C.U.** (2003). Coupled folding during translation initiation. *Cell* **115**(6), 650-2.
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J. y Poncet, D.** (1998). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* **17**(19), 5811-21.
- Prevot, D., Darlix, J.L. y Ohlmann, T.** (2003). Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol. Cell* **95**(3-4), 141-56.
- Purcell, D.F. y Martin, M.A.** (1993). Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J. Virol.* **67**(11), 6365-78.
- Pyronnet, S., Dostie, J. y Sonenberg, N.** (2001). Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes Dev.* **15**(16), 2083-93.
- Qin, H., Raught, B., Sonenberg, N., Goldstein, E.G. y Edelman, A.M.** (2003). Phosphorylation screening identifies translational initiation factor 4GII as an intracellular target of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase I. *J. Biol. Chem.* **278**(49), 48570-9.
- Raught, B., Gingras, A.C., Gygi, S.P., Imataka, H., Morino, S., Gradi, A., Aebersold, R. y Sonenberg, N.** (2000). Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4GI. *EMBO J.* **19**(3), 434-44.
- Richter, J.D. y Sonenberg, N.** (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* **433**(7025), 477-80.
- Rodriguez, P.L.** (1994). "Caracterización funcional de proteínas de poliovirus. Clonación y expresión de la proteína 2C."
- Rodriguez Pulido, M., Serrano, P., Saiz, M. y Martinez-Salas, E.** (2007). Foot-and-mouth disease virus infection induces proteolytic cleavage of PTB, eIF3a,b, and PABP RNA-binding proteins. *Virology* **364**(2), 466-74.
- Rogers, G.W., Jr., Komar, A.A. y Merrick, W.C.** (2002). eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **72**, 307-31.
- Rubtsova, M.P., Sizova, D.V., Dmitriev, S.E., Ivanov, D.S., Prassolov, V.S. y Shatsky, I.N.** (2003). Distinctive properties of the 5'-untranslated region of human hsp70 mRNA. *J. Biol. Chem.* **278**(25), 22350-6.
- Sachs, A.B. y Kornberg, R.D.** (1985). Nuclear polyadenylate-binding protein. *Mol. Cell Biol.* **5**(8), 1993-6.

- Sachs, A.B., Bond, M.W. y Kornberg, R.D.** (1986). A single gene from yeast for both nuclear and cytoplasmic polyadenylate-binding proteins: domain structure and expression. *Cell* **45**(6), 827-35.
- Sambrook, J., Fritsch, E.R. y Maniatis, T.** (2001). "Molecular cloning: A laboratory manual." (N. Y. Cold Spring Harbor Press, Ed.), NY.
- Sanz, M.A.** (1998). "Caracterización funcional de la proteína 6K de alfavirus. El virus Sindbis como vector de expresión." Tesis Doctoral: Universidad Autónoma de Madrid Madrid.
- Sanz, M.A. y Carrasco, L.** (2001). Sindbis virus variant with a deletion in the 6K gene shows defects in glycoprotein processing and trafficking: lack of complementation by a wild-type 6K gene in trans. *J. Virol.* **75**(16), 7778-84.
- Sanz, M.A., Castello, A. y Carrasco, L.** (2007). Viral translation is coupled to transcription in Sindbis virus-infected cells. *J. Virol.* **81**(13), 7061-8.
- Schneider, R.J. y Mohr, I.** (2003). Translation initiation and viral tricks. *Trends Biochem. Sci.* **28**(3), 130-6.
- Schwartz, L.B., Lawrence, C., Thach, R.E. y Roeder, R.G.** (1974). Encephalomyocarditis virus infection of mouse plasmacytoma cells. II. Effect on host RNA synthesis and RNA polymerases. *J. Virol.* **14**(3), 611-9.
- Semler, B.L. y Wimmer, E.** (2002). "Molecular biology of picornaviruses." ASM Press, Washington, DC.
- Sharma, R., Raychaudhuri, S. y Dasgupta, A.** (2004). Nuclear entry of poliovirus protease-polymerase precursor 3CD: implications for host cell transcription shut-off. *Virology* **320**(2), 195-205.
- Shpargel, K.B. y Matera, A.G.** (2005). Gemin proteins are required for efficient assembly of Sm-class ribonucleoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**(48), 17372-7.
- Siddiqui, N., Kozlov, G., D'Orso, I., Trempe, J.F. y Gehring, K.** (2003). Solution structure of the C-terminal domain from poly(A)-binding protein in *Trypanosoma cruzi*: a vegetal PABC domain. *Protein Sci.* **12**(9), 1925-33.
- Sonenberg, N. y Dever, T.E.** (2003). Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**(1), 56-63.
- Song, Y., Tzima, E., Ochs, K., Bassili, G., Trusheim, H., Linder, M., Preissner, K.T. y Niepmann, M.** (2005). Evidence for an RNA chaperone function of polypyrimidine tract-binding protein in picornavirus translation. *RNA* **11**(12), 1809-24.
- Studier, F.W. y Moffatt, B.A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**(1), 113-30.
- Svitkin, Y.V., Gradi, A., Imataka, H., Morino, S. y Sonenberg, N.** (1999). Eukaryotic initiation factor 4GII (eIF4GII), but not eIF4GI, cleavage correlates with inhibition of host cell protein synthesis after human rhinovirus infection. *J. Virol.* **73**(4), 3467-72.

- Svitkin, Y.V., Imataka, H., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., Liebig, H.D. y Sonenberg, N.** (2001). Poly(A)-binding protein interaction with eIF4G stimulates picornavirus IRES-dependent translation. *RNA* **7**(12), 1743-52.
- Svitkin, Y.V. y Sonenberg, N.** (2004). An efficient system for cap- and poly(A)-dependent translation in vitro. *Methods Mol Biol* **257**, 155-70.
- Svitkin, Y.V., Herdy, B., Costa-Mattioli, M., Gingras, A.C., Raught, B. y Sonenberg, N.** (2005). Eukaryotic translation initiation factor 4E availability controls the switch between cap-dependent and internal ribosomal entry site-mediated translation. *Mol. Cell Biol.* **25**(23), 10556-65.
- Tahara, S.M., Morgan, M.A. y Shatkin, A.J.** (1981). Two forms of purified m7G-cap binding protein with different effects on capped mRNA translation in extracts of uninfected and poliovirus-infected HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **256**(15), 7691-4.
- Thomas, A.A., Scheper, G.C., Kleijn, M., De Boer, M. y Voorma, H.O.** (1992). Dependence of the adenovirus tripartite leader on the p220 subunit of eukaryotic initiation factor 4F during in vitro translation. Effect of p220 cleavage by foot-and-mouth-disease-virus L-protease on in vitro translation. *Eur. J. Biochem.* **207**(2), 471-7.
- Uchida, N., Hoshino, S., Imataka, H., Sonenberg, N. y Katada, T.** (2002). A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation. *J. Biol. Chem.* **277**(52), 50286-92.
- Ventoso, I., Barco, A. y Carrasco, L.** (1998). Mutational analysis of poliovirus 2Apro. Distinct inhibitory functions of 2Apro on translation and transcription. *J. Biol. Chem.* **273**(43), 27960-7.
- Ventoso, I., Blanco, R., Perales, C. y Carrasco, L.** (2001). HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**(23), 12966-71.
- Ventoso, I., Sanz, M.A., Molina, S., Berlanga, J.J., Carrasco, L. y Esteban, M.** (2006). Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2alpha phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes Dev.* **20**(1), 87-100.
- Vilela, C., Velasco, C., Ptushkina, M. y McCarthy, J.E.** (2000). The eukaryotic mRNA decapping protein Dcp1 interacts physically and functionally with the eIF4F translation initiation complex. *EMBO J.* **19**(16), 4372-82.
- von Der Haar, T., Ball, P.D. y McCarthy, J.E.** (2000). Stabilization of eukaryotic initiation factor 4E binding to the mRNA 5'-Cap by domains of eIF4G. *J. Biol. Chem.* **275**(39), 30551-5.
- Walter, B.L., Nguyen, J.H., Ehrenfeld, E. y Semler, B.L.** (1999). Differential utilization of poly(rC) binding protein 2 in translation directed by picornavirus IRES elements. *RNA* **5**(12), 1570-85.
- Watakabe, A., Tanaka, K. y Shimura, Y.** (1993). The role of exon sequences in splice site selection. *Genes Dev.* **7**(3), 407-18.
- Weidman, M.K., Sharma, R., Raychaudhuri, S., Kundu, P., Tsai, W. y Dasgupta, A.** (2003). The interaction of cytoplasmic RNA viruses with the nucleus. *Virus Res.* **95**(1-2), 75-85.
- Wek, R.C., Jiang, H.Y. y Anthony, T.G.** (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 1), 7-11.

- Willcocks, M.M., Carter, M.J. y Roberts, L.O.** (2004). Cleavage of eukaryotic initiation factor eIF4G and inhibition of host-cell protein synthesis during feline calicivirus infection. *J. Gen. Virol.* **85**(Pt 5), 1125-30.
- Yamanaka, S., Poksay, K.S., Arnold, K.S. y Innerarity, T.L.** (1997). A novel translational repressor mRNA is edited extensively in livers containing tumors caused by the transgene expression of the apoB mRNA-editing enzyme. *Genes Dev.* **11**(3), 321-33.
- Yan, R., Rychlik, W., Etchison, D. y Rhoads, R.E.** (1992). Amino acid sequence of the human protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma. *J. Biol. Chem.* **267**(32), 23226-31.
- Yueh, A. y Schneider, R.J.** (2000). Translation by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNAs facilitated by complementarity to 18S rRNA. *Genes Dev.* **14**(4), 414-21.
- Zapata, J.M., Martinez, M.A. y Sierra, J.M.** (1994). Purification and characterization of eukaryotic polypeptide chain initiation factor 4F from *Drosophila melanogaster* embryos. *J. Biol. Chem.* **269**(27), 18047-52.
- Zhang, B., Morace, G., Gauss-Muller, V. y Kusov, Y.** (2007). Poly(A) binding protein, C-terminally truncated by the hepatitis A virus proteinase 3C, inhibits viral translation. *Nucleic Acids Res.* **35**(17), 5975-84.
- Ziegler, E., Borman, A.M., Deliat, F.G., Liebig, H.D., Jugovic, D., Kean, K.M., Skern, T. y Kuechler, E.** (1995a). Picornavirus 2A proteinase-mediated stimulation of internal initiation of translation is dependent on enzymatic activity and the cleavage products of cellular proteins. *Virology* **213**(2), 549-57.
- Ziegler, E., Borman, A.M., Kirchweger, R., Skern, T. y Kean, K.M.** (1995b). Foot-and-mouth disease virus Lb proteinase can stimulate rhinovirus and enterovirus IRES-driven translation and cleave several proteins of cellular and viral origin. *J. Virol.* **69**(6), 3465-74.

ANEXO



Translation of Sindbis Virus 26 S mRNA Does Not Require Intact Eukariotic Initiation Factor 4G

Alfredo Castelló*, Miguel Ángel Sanz, Susana Molina and Luis Carrasco

Centro de Biología Molecular
"Severo Ochoa" (CSIC-UAM)
Facultad de Ciencias,
Universidad Autónoma de
Madrid, Cantoblanco, 28049
Madrid, Spain

The infection of baby hamster kidney (BHK) cells by Sindbis virus gives rise to a drastic inhibition of cellular translation, while under these conditions the synthesis of viral structural proteins directed by the subgenomic 26 S mRNA takes place efficiently. Here, the requirement for intact initiation factor eIF4G for the translation of this subgenomic mRNA has been examined. To this end, SV replicons that contain the protease of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) or the poliovirus 2A^{PRO} replacing the sequences of SV glycoproteins have been constructed. BHK cells electroporated with the different RNAs synthesize protein C and the corresponding protease at late times. Notably, the proteolysis of eIF4G by both proteases has little effect on the translation of the 26 S mRNA. In addition, recombinant viable SVs were engineered that encode HIV-1 PR or poliovirus 2A protease under the control of a duplicated late promoter. Viral protein synthesis at late times of infection by the recombinant viruses is slightly affected in BHK cells that contain proteolysed eIF4G. The translatability of SV genomic 49 S mRNA was assayed in BHK cells infected with a recombinant virus that synthesizes luciferase and transfected with a replicon that expresses poliovirus 2A^{PRO}. Under conditions where eIF4G has been hydrolysed significantly the translation of genomic SV RNA was deeply inhibited. These findings indicate a different requirement for intact eIF4G in the translation of genomic and subgenomic SV mRNAs. Finally, the translation of the reporter gene that encodes green fluorescent protein, placed under the control of a second duplicate late promoter, is also resistant to the cleavage of eIF4G. In conclusion, despite the presence of a cap structure in the 5' end of the subgenomic SV mRNA, intact eIF4G is not necessary for its translation.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: alphavirus translation; Sindbis virus; eIF4G; regulation of translation; translation initiation factors

*Corresponding author

Introduction

Sindbis virus (SV) belongs to the Togaviridae family and is a prototype member of the *Alphavirus* genus. The SV genome is a single-stranded ~11.7 kb RNA of positive polarity. The two-thirds located at the 5' end of the genome encode for the

non-structural proteins (nsP1–nsP4), while the rest of this RNA encodes the structural proteins. The nucleocapsid is composed of 240 units of capsid protein (C) wrapped around one copy of the genomic RNA and is surrounded by a lipidic envelope that contains the glycoproteins E1 and E2. After virus entry, the genomic RNA is initially engaged in translation, directing the synthesis of the early proteins nsP1–nsP4. These proteins are necessary to replicate and transcribe the SV RNAs. Viral transcription uses the minus-strand RNA complementary to the genome as a template to synthesize more copies of genomic 49 S RNA and subgenomic 26 S messenger RNA (mRNA).^{1,2} Both mRNAs contain a cap structure at the 5' end and a poly(A) tail at their 3' end.^{3,4} The proteins (C-E3-E2-6K-E1) encoded by the subgenomic mRNA are synthesized as a polyprotein that is processed

Abbreviations used: SV, Sindbis virus; C protein, capsid protein; EMCV, encephalomyocarditis virus; IRES, internal ribosomal entry site; PABP, poly(A)-binding protein; VSV, vesicular stomatitis virus; hpe, time (h) post electroporation; SQ, saquinavir; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; PR, protease; hpi, time (h) post infection; nsP, non-structural protein; GFP, green fluorescent protein; UTR, untranslated region.

E-mail address of the corresponding author:
acastello@cbm.uam.es

proteolytically. Once the C protein is made, it is liberated to the cytoplasm by autocatalytic activity.⁵ Translation of the 26 S mRNA continues, associated with the endoplasmic reticulum membranes, giving rise to the synthesis of the three glycoproteins E3, E2 and E1, and the viroporin 6K.^{1,2,6} All the cleavages between the glycoproteins and 6K are accomplished by cellular proteases present in the vesicular system, during their trafficking to the plasma membrane, where virus budding takes place.^{1,2}

The SV lytic cycle exhibits two well-defined stages. During the early phase, cellular translation and the synthesis of nsPs from the genomic RNA takes place. About 2–4 h after SV infection, the pattern of protein synthesis changes drastically in such a way that the structural proteins are mostly synthesized.⁷ Thus, SV infection constitutes one of the best models to study the regulation of translation in virus-infected animal cells. The aim of the present work was to gain an understanding of the requirements for translation of SV subgenomic mRNA under conditions that hamper the translation of cellular and SV genomic mRNAs.^{3,4,7} To this end, the requirement for a canonical translation initiation complex to translate this subgenomic mRNA was assayed. Since eIF4G plays a key role in the regulation of the initiation of protein synthesis in many virus-cell systems analysed, we have studied the relevance of this factor for the initiation of translation of the SV RNAs.^{8–10}

eIF4G is a large modular polypeptide that interacts with different cellular and viral proteins. There are two isoforms of eIF4G in eukaryotic cells, known as eIF4GI and eIF4GII, which exhibit similar biochemical activities.⁹ The eIF4G interacts with eIF4E (cap-binding protein)¹¹ and eIF4A (RNA helicase),^{12,13} forming the eIF4F complex. In addition, eIF4G can bind to the 43 S preinitiation complex by interacting with eIF3.¹⁴ It was reported recently that eIF4G interacts also with poly(A)-binding protein (PABP),^{15–17} thus promoting the circularization of mRNA. All these features make eIF4G essential for the correct assembly of the translation initiation machinery. Besides, eIF4G can interact with other translation regulatory proteins, such as nuclear cap binding protein CBP80, the decapping enzyme Dcp1, the eIF4E kinase Mnk1 and heat-shock proteins such as hsp27.⁹ Moreover, viral proteins such as NSP3 from rotavirus, influenza virus NS1^{18,19} and the 100 kDa adenoviral late protein²⁰ also bind to eIF4G. Notably, eIF4G associated with eIF4A can interact directly with the internal ribosome entry site (IRES) from both encephalomyocarditis virus (EMCV) or foot and mouth disease virus (FMDV).²¹

Picornaviral proteases have the ability to bisect the two forms of eIF4G, while some retroviral proteases cleave eIF4GI selectively, leaving eIF4GII intact to a large extent. Furthermore, picornavirus proteases have just one cleavage recognition site in eIF4G, dividing the factor in two moieties, while the proteases from retroviruses hydrolyse eIF4G at two

different sites, yielding three cleavage products.^{22–27} The proteolysis of eIF4G impairs the translation of newly made cellular mRNAs, but translation of the mRNAs already engaged in translation are much less affected.^{28–30} Curiously, some mRNAs from viruses that do not hydrolyse eIF4G during their infections can be translated efficiently when eIF4G has been cleaved. This is the case for the EMCV RNA, which contains an internal ribosomal entry site (IRES) element in its leader sequence.^{31,32} In addition, the expression of poliovirus 2A^{pro} in cells transfected with a plasmid encoding 2A proteolysed eIF4G efficiently, impairing the translation of typical capped virus mRNAs from the vesicular stomatitis virus (VSV) or the recombinant vaccinia virus T7.³³ Besides, inducible expression of poliovirus 2A^{pro} from a stable HeLa cell line led to eIF4G cleavage and strongly inhibited cellular and vaccinia virus protein synthesis.³⁴ In contrast, evidence has been provided that some vaccinia RNAs have a low requirement for intact eIF4F.^{35,36} Moreover, it has been reported that adenovirus and VSV infection induce a progressive dephosphorylation of eIF4E, impairing cap-dependent translation, while viral mRNAs continue to be translated.^{20,37} Although alphavirus infection does not lead to cleavage of eIF4G, it was of interest to test whether this factor was required to translate SV mRNAs. Here, we report that the SV subgenomic mRNA is translated in baby hamster kidney (BHK) cells that contain eIF4G cleaved by poliovirus 2A^{pro} or the protease of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1 PR).

Results

Cleavage of eIF4G by HIV1 PR and poliovirus 2A^{pro} in BHK cells. Translation of the SV subgenomic mRNA

The aim of this work was to analyse the translation of the SV subgenomic mRNA under conditions where eIF4G has been degraded proteolytically by two viral proteases, HIV-1 PR or poliovirus 2A^{pro}. These proteases cleave eIF4G in different manners (see above). Under these conditions, cap-dependent translation mediated by eIF4E does not occur.^{9,10,29,30} Initially, different constructs were engineered, based on an SV replicon that bears the capsid protein (C) followed by the protease gene (Figure 1(b)). These replicons lack the rest of the SV late sequences and efficiently express the gene placed after C.⁶ Since this capsid protein is endowed with autoproteolytic activity, the translation efficiency of this mRNA can be estimated by measuring the synthesis of the C protein. Two different replicons were obtained, bearing either HIV-1 protease (PR) (Rep C-PR) or the poliovirus 2A^{pro} gene (Rep C-2A) (Figure 1(b)). BHK cells were electroporated with the *in vitro* transcribed RNAs from plasmids encoding Rep C and Rep C-PR. After 16 h post electroporation

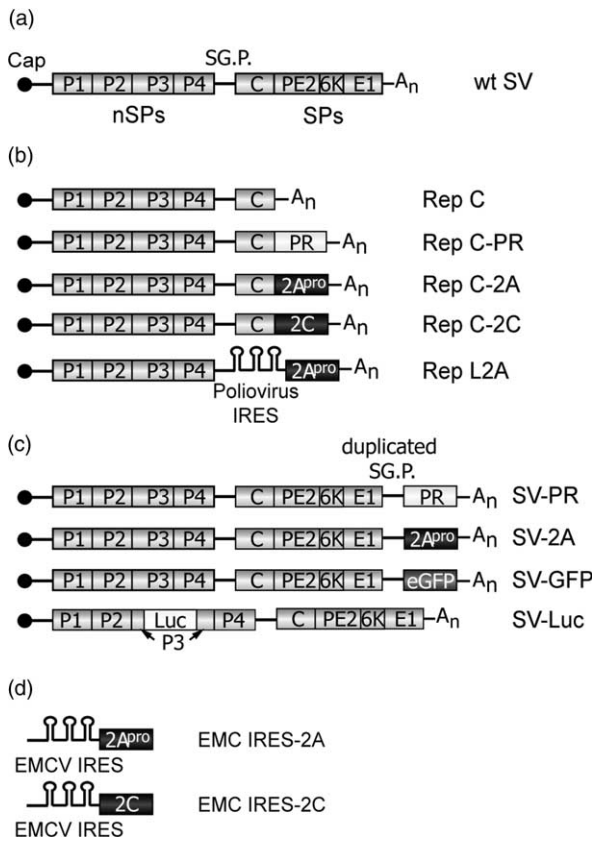


Figure 1. A representation of; (a) full-length wt SV RNA genome; (b) SV replicons containing SV C protein followed by a heterologous gene, or poliovirus IRES after the SV subgenomic promoter (SG.P) and followed by 2A^{Pro}, as indicated. (c) Recombinant SV RNAs that possess heterologous genes placed under the control of a duplicated subgenomic promoter and recombinant SV containing the luciferase gene placed inside the nsP3 sequence. (d) *In vitro* transcribed mRNAs from pTM1-2A and pTM1-2C that contain only the EMCV leader sequence and poliovirus 2A or 2C gene.

(hpe), the integrity of eIF4G was estimated by Western blotting, and protein synthesis was analysed by SDS-PAGE. Previous analyses of eIF4G using specific antibodies have revealed the existence of two proteins of ~220 kDa and ~150 kDa in BHK cells. As already described, eIF4G exhibits different mobility patterns in SDS-PAGE in mammalian cells, possibly due to post-translational modifications.^{24,29} Most probably, the protein of 150 kDa corresponds to a full-length eIF4G that has not undergone the putative post-translational modification. Alternatively, it has been proposed that it could be a breakdown product of eIF4G.²⁹ Both polypeptides of 220 kDa and 150 kDa disappeared in 2A^{Pro} and in HIV-1PR-expressing cells (Figure 2(a) and (b), upper panels).^{31,38} In cells electroporated with Rep C-PR there is about 70% of eIF4GI cleavage as measured by densitometry of the 220 kDa band (Figure 2(a), upper panel). In agreement with previous reports, eIF4GII remained

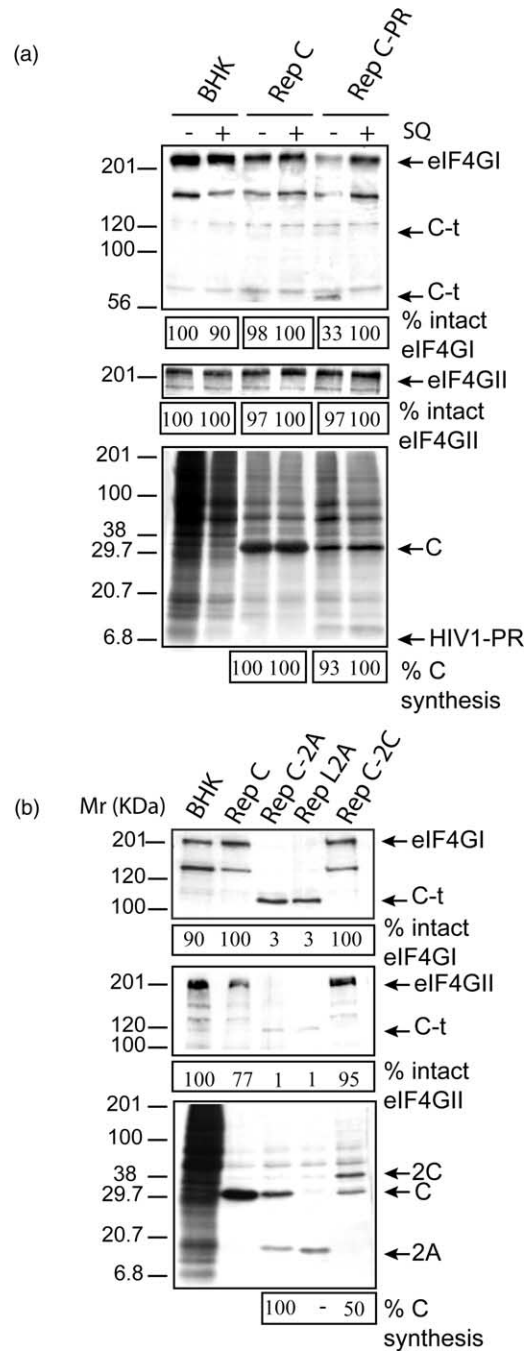


Figure 2. Dependence of 26 S mRNA translation on intact eIF4G using different SV replicons. BHK cells were electroporated with transcription buffer (BHK), Rep C or Rep C-PR and grown (a) in the presence or in the absence of 12 μM saquinavir (SQ); or (b) with transcription buffer, Rep C, Rep C-2A, Rep L2A or Rep C-2C. (a) and (b) Lower panels, proteins were labelled with [³⁵S]Met/Cys from 15 to 16 hpe and processed as described in Materials and Methods). Aliquots were analysed by Western blotting with specific antisera against (a) and (b), upper panels, eIF4GI; or (a) and (b), lower panels, eIF4GII. Percentage of capsid protein synthesis or intact eIF4GI and eIF4GII were determined by densitometric scanning of the corresponding protein band. Ct, C-terminal fragments of eIF4GI or eIF4GII. C, capsid SV protein. Mr (kDa), molecular mass markers.

uncleaved in these cells (Figure 2(a), middle panel).^{26,32} We could detect the C-terminal proteolytic fragment only with the anti-eIF4GI and anti-eIF4GII antibodies in BHK-21 cells.³¹ The presence of saquinavir (SQ), a specific inhibitor of the HIV protease, prevented eIF4GI cleavage (Figure 2(a), upper panel), while SQ itself had no effect on the expression of Rep C (Figure 2(a), lower panel). Since the fraction of electroporated cells in this experiment was about 70%, as estimated by the remaining cellular translation as well as the percentage of cell rounding (see below), the amount of uncleaved eIF4G may correspond to non-electroporated cells that do not express HIV-1 PR (Figure 2(a)). Notably, the synthesis of C protein from cells electroporated with Rep C-PR was similar in the absence or in the presence of SQ, i.e. the level of C synthesis was the same whether eIF4GI was intact or had been cleaved (Figure 2(a)). As observed previously in our laboratory, C protein is synthesized more efficiently when Rep C is used, as compared to replicons that bear another gene located after the C sequence, even when the SV 6K gene is positioned at the same place.⁶

The HIV-1 PR uses eIF4GI as a substrate, while eIF4GII is poorly recognized.^{26,32} By contrast, poliovirus 2A^{pro} can bisect both forms of this initiation factor.²³ Hence, it was of interest to test the effect of 2A^{pro} activity on the translation of the SV subgenomic mRNA. To this end, cells were electroporated with transcription buffer or with the RNAs obtained from Rep C, Rep C-2A, Rep L2A and Rep C-2C.^{6,39} The protease synthesized from Rep C-2A contains four extra amino acid residues at its N terminus that do not hamper its proteolytic activity as compared with the native 2A^{pro} produced from Rep L2A (Figure 2(b), lower and middle panels). Over 90% cleavage of both forms of the initiation factor was seen at 8 hpe (data not shown) and at 16 hpe (Figure 2(b), upper and middle panels). Under these conditions, significant amounts of C protein synthesis were still observed (Figure 2(b), lower panel). As a control, a replicon that encodes poliovirus 2C (Rep C-2C) was employed (Figure 1(b)). The levels of C synthesis with Rep C-2A were twofold higher as compared to Rep C-2C, irrespective of the amount of intact eIF4GI and eIF4GII present in cells (Figure 2(b)). Similar to Rep C-PR (Figure 2(a), lower panel), C expression from Rep C was threefold higher than from Rep C-2A (Figure 2(b), lower panel) and twofold higher as compared with Rep C-6K (data not shown). These differences in the expression of the replicons were reproduced in three independent experiments. These findings support the notion that the translation of the SV subgenomic mRNA can occur even when both forms of eIF4G have been proteolysed. Notably, nsP1 accumulation was similar in HIV-1 PR and 2A^{pro}-expressing cells compared with cells electroporated with Rep C (Data not shown). Protease expression from subgenomic mRNA takes place after the synthesis of non-structural proteins.

The levels of subgenomic mRNAs were examined in transfected cells (Figure 3(a)) to determine if the different amounts of C synthesis obtained from Rep C, Rep C-PR and Rep C-2A were the reflection of a partial inhibition of translation. For this purpose, real-time reverse transcriptase (RT)-PCR was carried out to quantify the number of SV RNA molecules in 2×10^5 cells. After transfection and RNA extraction, real-time RT-PCR revealed that the amount of SV subgenomic RNA was tenfold higher than SV genomic RNA from Rep C-expressing cells (data not shown). The level of SV subgenomic mRNA obtained from BHK cells transfected with Rep C-PR was about 60% as compared to the subgenomic mRNA synthesized from cells transfected with Rep C (Figure 3(a)). In the case of Rep C-2A, the level of SV subgenomic RNA was about 40% compared with Rep C (Figure 3(a)). The amount of genomic RNA was much more diminished than subgenomic mRNA in Rep C-2A-expressing cells (Figure 3(a)). Taking into account the RNA levels, the normalization of translation data revealed that C synthesis was 70% in Rep C-PR and Rep C-2A compared to the control Rep C (Figure 3(b)).

Cleavage of eIF4G profoundly blocks the translation of newly made mRNAs, while protein

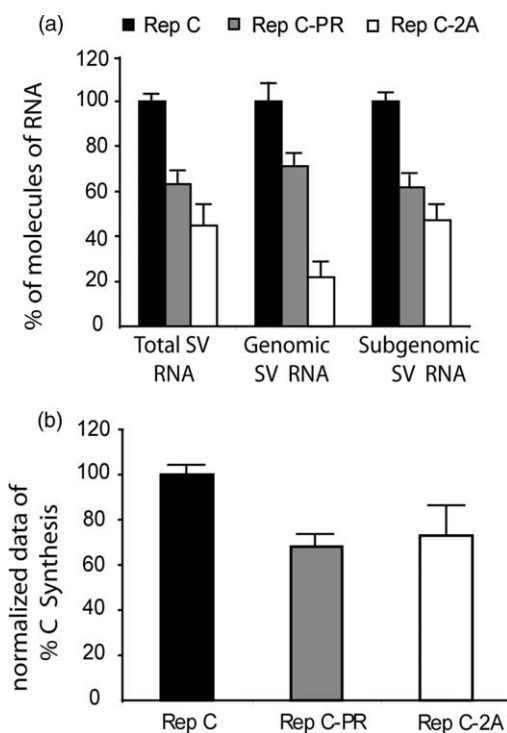


Figure 3. Analysis of SV RNA levels by RT-PCR. (a) The SV genomic and subgenomic RNAs were isolated at 16 hpe from cells transfected with the different SV replicons and quantified as described in Materials and Methods. The data are presented as a relative comparison of Rep C-PR or Rep C-2A RNAs levels with Rep C. (b) Representation of 26 S normalized mRNA translation considering the level of SV subgenomic mRNA in electroporated cells. The C synthesis values were corrected to the relative amount of SV subgenomic mRNA and calculated on the basis of values obtained for Rep C.

synthesis of cellular mRNAs already engaged in translation is not inhibited greatly.²⁸⁻³⁰ To analyse whether the first event of translation of the subgenomic 26 S mRNA can take place in cells containing cleaved eIF4G, we carried out a run-off assay (Figure 4(a)). When cells are incubated in hypertonic medium, run-off of polysomes occurs, thus blocking initiation of translation, while elongation still occurs. A return to normal medium leads to initiation of translation on mRNA in treated cells.³⁰ Cells were electroporated with Rep C, Rep C-2A or mRNA transcribed from pTM1-2A containing EMC IRES, followed by a 2A^{pro} sequence (EMC IRES-2A) (Figure 1(d)). As a control, cells electroporated with transcription buffer in the absence of RNA were used. Over 95% of eIF4GI and eIF4GII were cleaved in 2A^{pro}-expressing cells at 16 hpe (Figure 4(b), upper and middle panels). Under these conditions, C synthesis in cells electroporated with Rep C was threefold higher than in Rep C-2A-expressing cells (Figure 4(b), lower panel). This result was similar to that shown

in Figure 2(b). At 16 hpe, NaCl was added to a final concentration of 300 mM, and the cells were incubated for 2 h. Under these hypertonic conditions, protein synthesis was blocked to a great extent (Figure 4(b), lower panel). Upon return to normal medium, cellular protein synthesis was re-established quickly in cells electroporated with transcription buffer (Figure 4(b), lower panel). As expected, cellular mRNAs cannot initiate their translation when eIF4G was hydrolysed by 2A^{pro} produced from EMC IRES-2A (Figure 4(b)). In contrast, the translation of C protein from the SV subgenomic mRNA was restored after return to normal medium. Thus, the (3:1) ratio observed for C synthesis from Rep C and Rep C-2A was recovered even when both eIF4GI and eIF4GII were proteolysed by 2A^{pro} (Figure 4(b)). This finding indicates that the first initiation event directed by subgenomic mRNA takes place when eIF4G has been cleaved.

Recombinant viable SVs that express HIV-1 PR or poliovirus 2A^{pro}

Once we found that the late SV mRNA could be translated in BHK cells containing cleaved eIF4G, we decided to construct recombinant SVs that express the two different viral proteases as depicted in Figure 1(c). We expected these viruses to be viable, since they contain all non-structural and structural SV genes. The protease gene is placed under the control of a duplicated late promoter. The heterologous protein is produced less efficiently from these recombinant SVs than in the previous constructs using replicons.⁴⁰ Unlike the replicons, in this case, the subgenomic 26 S mRNA remains intact, directing the synthesis of all SV late proteins, while the heterologous protease is synthesized from another subgenomic mRNA. Once the different plasmids were obtained, the transcribed RNAs corresponding to wild-type (wt) SV, SV-PR and SV-2A were electroporated and protein synthesis and the integrity of the two isoforms of eIF4G were examined at 8 hpe in three independent experiments. HIV-1 PR was analysed by Western blotting in cells treated or not treated with SQ (Figure 5(b), lower panel). The expression of HIV-1 PR in this system led to over 85% cleavage of eIF4GI, while SQ blocked this proteolysis (Figure 5(a), upper panel). The synthesis of C protein in HIV-1 PR-expressing cells with SQ was about 25–35% higher as compared to that observed in the absence of the inhibitor, and was similar to wt SV (Figure 5(b), upper panel). The expression of poliovirus 2A^{pro} from the corresponding recombinant SV caused a drastic cleavage of both eIF4GI and eIF4GII (Figure 5(a)). The production of SV C protein was nearly 50–60% as compared to wt SV (Figure 5(b), upper panel). A background of about 10–20% cellular protein synthesis was seen in cells electroporated with SV-PR (without SQ) and SV-2A (Figure 5(b), upper panel), most probably corresponding to non-electroporated cells.

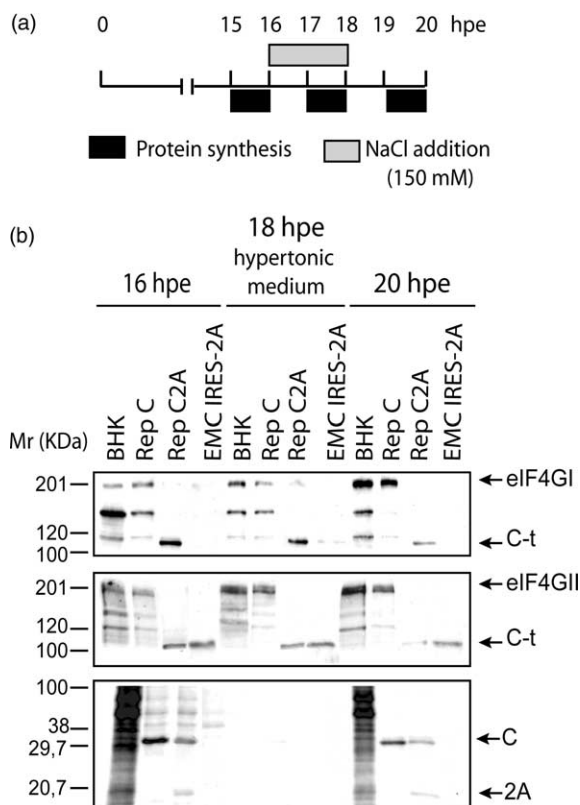


Figure 4. Effect of eIF4G cleavage on the reinitiation of SV protein synthesis after exposure to hypertonic medium. BHK cells were electroporated with transcription buffer (BHK), Rep C or Rep C-2A. From 16 to 18 hpe, the concentration of NaCl in the medium was increased to 300 mM. At 18 hpe, isotonicity was restored. From 15 to 16 hpe, 17 to 18 hpe and 19 to 20 hpe, cell cultures were labelled for 1 h. (a) A representation of the protocol. (b) Upper panel, Western blotting against eIF4GI; middle panel, Western blotting against eIF4GII; lower panel, protein synthesis analysed by fluorography and autoradiography.

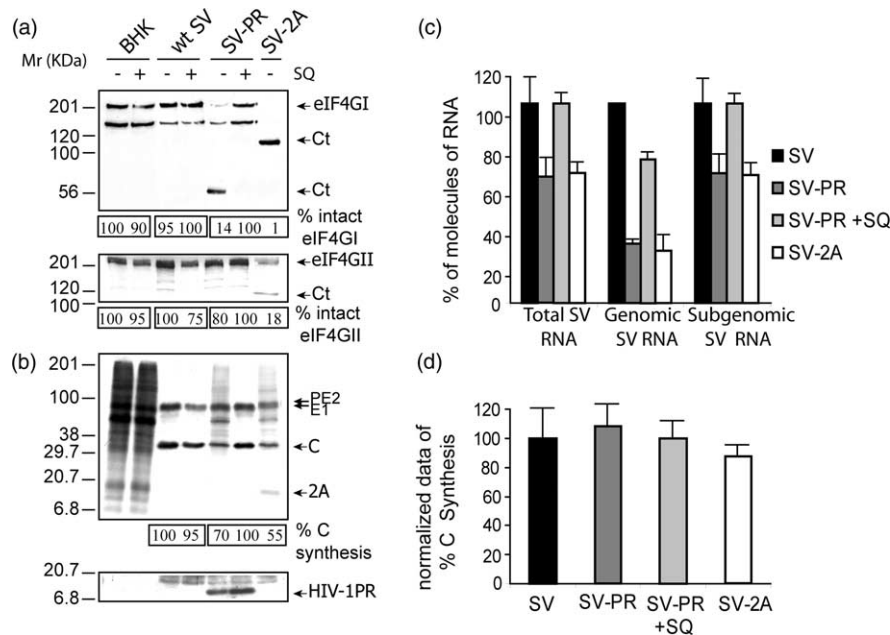


Figure 5. Effect of eIF4G cleavage on the translation of 26 S mRNA using recombinant SVs that express heterologous proteases. Cells were electroporated with transcription buffer (BHK), wt SV, SV-PR or SV-2A RNAs, grown in the presence or in the absence of 12 μ M saquinavir, labelled with [35 S]Met-[35 S]Cys from 7 to 8 hpe. Aliquots of the same samples were analysed by Western blotting with specific antisera against eIF4GI ((a), upper panel), eIF4GII ((a), lower panel) and HIV-1 PR ((b), lower panel) and fluorography and autoradiography ((b), upper panel). Percentages of capsid protein synthesis or intact eIF4GI and eIF4GII were determined by densitometric scanning of the corresponding protein band. (c) Analysis of SV RNA levels by RT-PCR. The SV genomic and subgenomic RNAs were isolated from transfected cells and quantified as described in Materials and Methods. The data are presented as relative comparison of SV-PR, in the absence and in the presence of SQ, or SV-2A RNA levels as compared to wt SV. (d) Representation of normalized 26 S mRNA translation considering the level of SV subgenomic mRNA in electroporated cells. C synthesis was corrected to the relative amount of SV subgenomic mRNA.

The levels of SV RNAs were then analysed by real time RT-PCR as described above. As with Rep C, the amount of SV subgenomic mRNA in wt SV electroporated cells was tenfold higher as compared with SV genomic RNA (data not shown). Both SV-PR and SV-2A exhibited a decrease of about 30–45% of subgenomic mRNA compared to controls wt SV and SV-PR in the presence of SQ (Figure 5(c)). Notably, the amount of SV genomic RNA was greatly diminished in SV-PR and SV-2A transfected cells (Figure 5(c)). Thus, the presence of SQ abrogates the inhibition of SV RNAs (Figure 5(c)). The normalization of translation of SV structural proteins, taking into consideration the values of SV subgenomic RNA, reflected the fact that the expression from the two recombinant viruses was similar to wt SV, even when both forms of eIF4G were cleaved by the two viral proteases (Figure 5(d)).

Next, cytotoxicity of the recombinant SVs was analysed. The expression of HIV-1 PR or 2A^{PRO} in BHK cells enhanced cell rounding to about 80% compared with wt SV at 16 hpe (data not shown). The virus titer obtained for SV-PR was one order of magnitude lower in the absence (10^7 pfu/ml) than in the presence (10^8 pfu/ml) of SQ, and the plaques were smaller and irregular when the protease inhibitor was absent (data not shown). These findings are consistent with the reduction of SV

genomic RNA observed in SV-PR and SV-2A-infected cells (Figure 5(c)), indicating that the inefficient replication of genomic RNA in the presence of HIV-1 PR or 2A^{PRO} in the later phase of SV infection impaired or diminished virus yield. The remaining cellular protein synthesis obtained in SV-PR, in the absence of SQ and SV-2A (Figure 5(b), upper panel), may correspond to non-electroporated cells that continue uninfected.

Culture supernatants were also employed to infect BHK and COS-7 cells in order to analyse SV protein synthesis and eIF4G cleavage. Infection occurred with the recombinant SV-PR as evidenced by the synthesis of viral proteins, although the level of cleavage of eIF4G was low (about 10–20%) (data not shown). These findings suggest that SV-PR readily loses its ability to express the protease gene when it replicates, even in the presence of SQ.

Effect of eIF4G cleavage on the translation of genomic SV RNA

The SV non-structural proteins (nsPs) are synthesized during the early phase of infection upon translation of the genomic 49 S RNA.^{2,7} To assay the requirement of intact eIF4G for the translation of genomic RNA, it is necessary to cleave eIF4G very early during SV infection. To this end, we have employed two strategies to cleave eIF4G efficiently.

One of them was based on the transfection of the SV replicon containing the poliovirus leader sequence followed by the 2A^{Pro} gene that replaces the region corresponding to the SV subgenomic RNA (Rep L2A) (Figure 1(b)). Synthesis of poliovirus 2A^{Pro} may occur either by internal initiation on genomic RNA, or after transcription of the corresponding subgenomic RNA. The other strategy made use of the electroporation of EMC IRES-2A RNA (Figure 1(d)). 2A^{Pro} expression from EMC IRES-2A is low, but it led to the cleavage of 80–100% eIF4GI and eIF4GII after 2 hpe (Figure 7(a)). To quantify the translation of the genomic SV RNA, recombinant

virus Toto1101/Luc (SV-Luc) containing the luciferase gene placed inside the nsP3 sequence was employed (Figure 1 (c)).⁴¹

BHK cells electroporated with transcription buffer, EMC IRES-2A, Rep C or Rep L2A were subsequently infected with SV-Luc at 1 hpe. As described previously, the expression of 2A^{Pro} does not block subsequent infections with poliovirus or EMCV.³⁴ 2A^{Pro}-expressing cells from Rep L2A or EMC IRES-2A exhibited an efficient cleavage of both eIF4GI and eIF4GII in such a way that at 4 h post infection (hpi) no intact eIF4G was observed (Figure 6(a)). After 2 hpi, a profound inhibition of

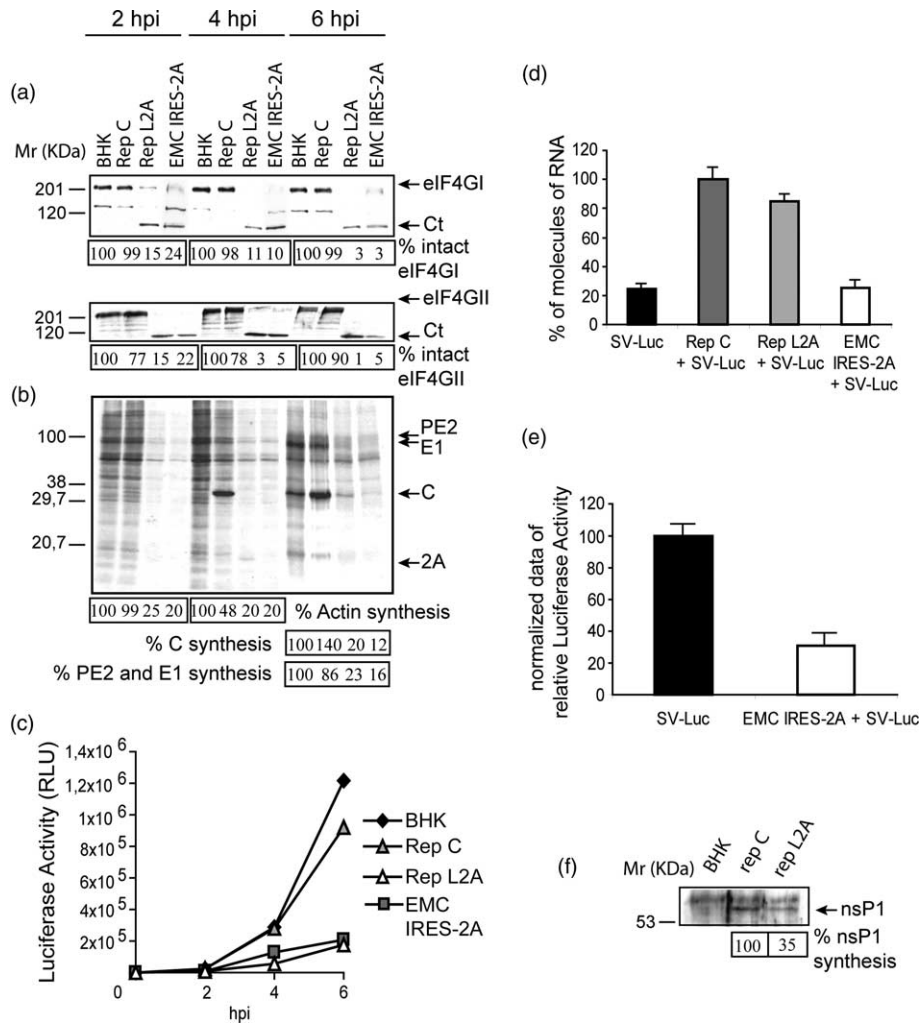


Figure 6. Dependence of translation of genomic SV mRNA on the integrity of eIF4G. Cells were electroporated with transcription buffer (BHK), EMC IRES-2A, Rep C or Rep L2A and infected at 1 hpe with SV-Luc. Cells were labelled with [³⁵S]Met-[³⁵S]Cys at different time-points, as indicated. (a) The integrity of eIF4GI and eIF4GII was analysed by Western blotting. (b) Cellular protein synthesis was examined by fluorography and autoradiography. Actin, C protein, SV glycoprotein (PE2 and E1) synthesis, nsP1 accumulation and percentage of proteolysis of eIF4GI and eIF4GII were determined by densitometric scanning of the corresponding protein band. (c) Cells were collected in luciferase lysis buffer at different time-points, as indicated. Luciferase activity was measured using a Monolight 2010 apparatus. (d) RNA was isolated at 2 hpi from SV-Luc infected cells as indicated in Materials and Methods. SV genomic RNA levels were analysed by RT-PCR. The data represent the relative comparison with the RNA isolated from cells electroporated with transcription buffer and infected with SV-Luc. (e) Normalization of percentage of luciferase activity at 2 hpi of cells electroporated with transcription buffer or EMC IRES-2A and infected at 1 hpe with SV-Luc. The luciferase activity values were corrected to the relative amount of SV-Luc genomic RNA and calculated based on values obtained for control cells infected with SV-Luc. (f) Cells were electroporated with transcription buffer, Rep C or Rep L2A. SV nsP1 accumulation was analysed by Western blotting against SV nsP1. Luc, luciferase; RLU, relative light units.

host protein synthesis was found in these cells (Figure 6(b)). At 6 hpi the SV-Luc structural proteins were measured. The level of synthesis of C protein was lower in cells electroporated with transcription buffer than in those electroporated with Rep C, since, in this last case, C was generated from Rep C and SV-Luc. PE2 precursor and E1 glycoprotein were produced only from SV-Luc, so they were synthesized in a similar fashion in both cases (Figure 6(b)). Notably, SV-Luc structural proteins were deeply inhibited in 2A-expressing cells (Figure 6(b)). Transcription to yield subgenomic mRNA requires the synthesis of non structural proteins to form the replicative complexes. Thus, the inhibition of the SV structural proteins in 2A^{Pro}-expressing cells may be due to the blockade of genomic RNA translation. Luciferase activity was determined in each case to quantify genomic RNA translation. A significant inhibition of luciferase synthesis (about 60–80%) was found throughout the time-course in 2A^{Pro}-expressing cells as compared to cells electroporated with transcription buffer or Rep C (Figure 6(c)). These results have been reproduced in three independent experiments.

Next, the inhibition of protein synthesis was calculated, considering the amount of genomic RNA present. To quantify this RNA in SV-Luc infected cells, real time RT-PCR was employed using oligonucleotides that hybridize with the nsP2 gene. In cells superinfected with an SV replicon and SV-Luc, the genomic RNA level was higher than in cells infected with only SV-Luc, since the nsP2 gene is contained in both constructs (Figure 6(d)). On the other hand, from 3–5 hpi, genomic RNA is employed in translation and RNA replication, and it is encapsidated to form viral particles.^{2,41} However, SV-Luc did not produce an effective infection when 2A^{Pro} was co-expressed in the early phase of the viral cycle, since structural proteins were inhibited (Figure 6(b)). Therefore, the genomic RNA level at 2 hpi was taken to normalize the luciferase activity data in control infected cells. The amount of SV-Luc genomic RNA present in cells electroporated with EMC IRES-2A was similar to control cells at 2 hpi (Figure 6(d)). However, it decreased progressively in 2A-expressing cells as compared to those electroporated with transcription buffer throughout the time-course, possibly due to the inhibition of nsP synthesis (data not shown). Relative luciferase activity was corrected, taking into account the values of SV-Luc genomic RNA. At 2 hpi, genomic RNA translation was about 30% when both forms of eIF4G were cleaved (Figure 6(e)). In addition, nsP1 was analysed by Western blotting, employing specific antiserum. The amount of nsP1 that accumulated in non-infected cells electroporated with Rep L2A was approximately 35–40% as compared with Rep C-expressing cells at 6 hpe (Figure 6(f)).

To analyse if the first translation initiation event directed by genomic RNA takes place even to a lesser degree, cells were electroporated with EMC IRES-2A or transcription buffer as a control and

were infected at 1 hpe, 2 hpe, 4 hpe or 6 hpe with SV-Luc. As expected, eIF4G was hydrolysed by 2A^{Pro} in a time-dependent manner and was cleaved almost totally at 4 hpe (Figure 7(a)). To analyse genomic RNA translation, luciferase activity was measured at 3 hpi in each case (Figure 7(b)). In accordance with the results shown in Figure 8, luciferase activity obtained when SV-Luc was

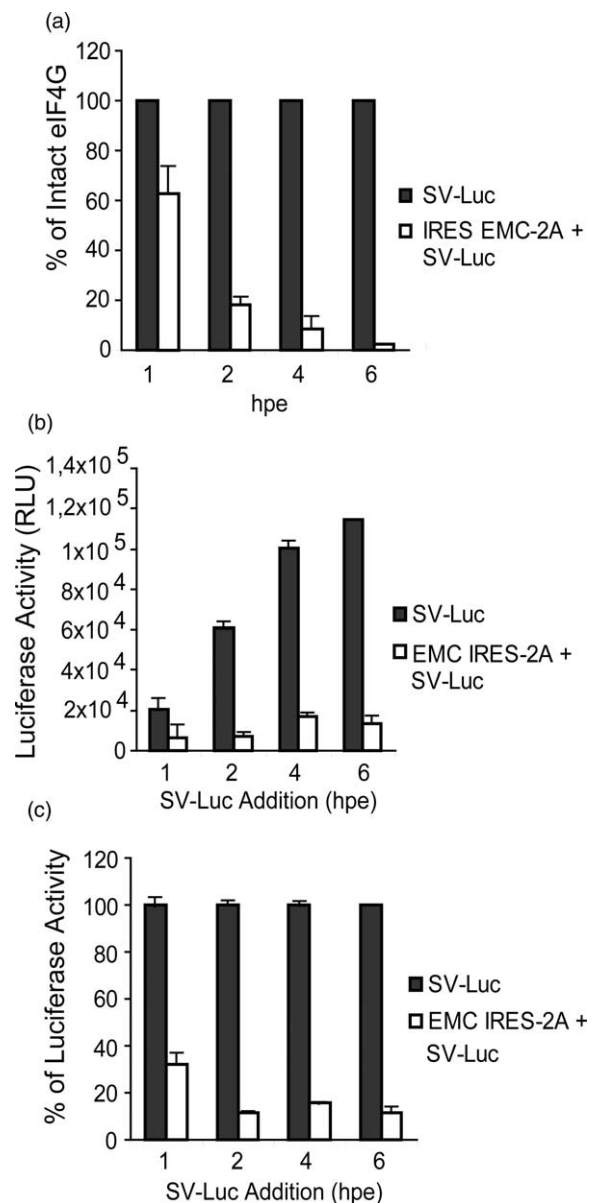


Figure 7. Effect of eIF4G cleavage on genomic SV translation initiation. Cells were electroporated with transcription buffer or EMC IRES-2A. (a) One half of cells were collected at 1 hpe, 2 hpe, 4 hpe and 6 hpe and eIF4GI and eIF4GII was analysed by Western blotting. The relative amount of intact eIF4G is represented. (b) The other half of the electroporated cells were infected at 1 hpe, 2 hpe, 4 hpe or 6 hpe with SV-Luc and collected in luciferase lysis buffer at 3 hpi. Luciferase activity was measured as described in Figure 8. The result is shown as the relative luciferase activity in cells extracts (expressed in light units set to 100% of control reactions).

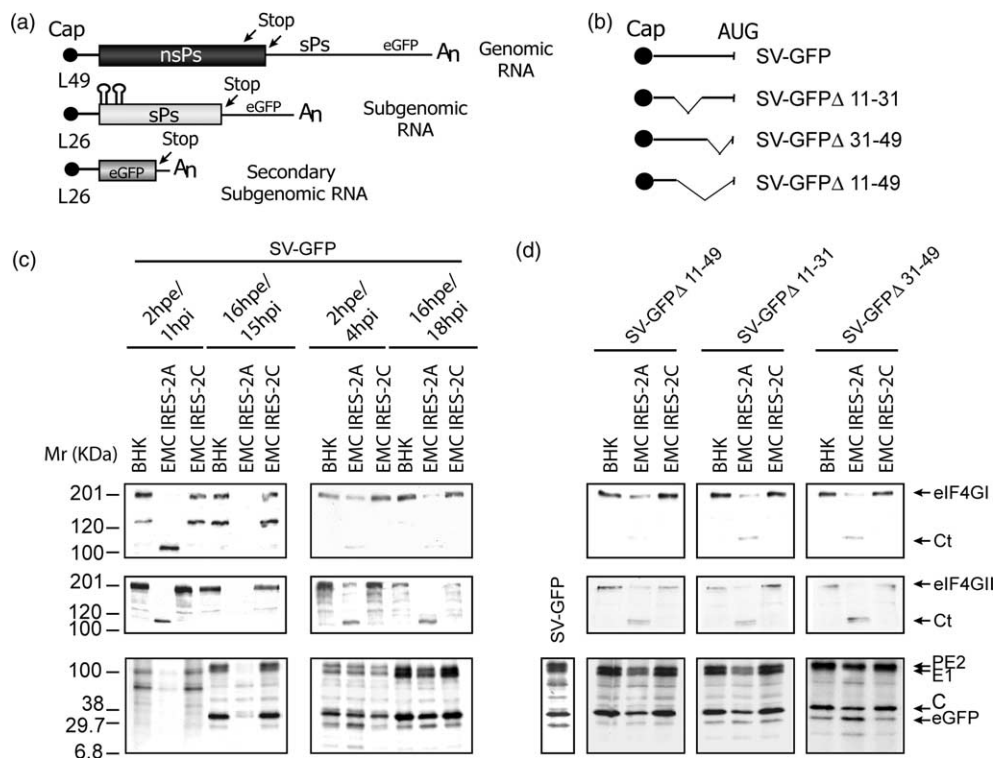


Figure 8. Effect of eIF4G cleavage on the translation of GFP mRNAs using recombinants SV. (a) A representation of mRNAs synthesized from SV-GFP. (b) A representation of the SV subgenomic leader sequence placed upstream of eGFP gene and the deletion variants. (c) Cells were electroporated with transcription buffer, EMC IRES-2A or EMC IRES-2C and infected with 10 pfu/cell of SV-GFP 2 h before or 1 h after electroporation. The cells were collected at the time-points indicated (d) Cells were infected with 10 pfu/cell of SV-GFPΔ11-49, SV-GFPΔ11-31 or SV-GFPΔ31-49 and at 2 hpi were electroporated with transcription buffer, EMC IRES-2A or EMC IRES-2C. The protein synthesis and the integrity of initiation factors were analysed at 16 hpe/18 hpi. (c) and (d) Upper panels, Western blotting against eIF4GI; middle panels, Western blotting against eIF4GII; lower panels, analysis of viral protein synthesis by fluorography and autoradiography. L49, genomic 49 S leader sequence. L26, subgenomic 26 S leader sequence. eGFP, enhanced green fluorescence protein.

added at 1 hpe was 25–35% in 2A-expressing cells, as compared to the control. Notably, when cells were infected with SV-Luc at 2 hpe, 4 hpe or 6 hpe, a decrease of about 85–90% was observed in genomic RNA translation in cells electroporated with EMC IRES-2A (Figure 7(c)). A significant correlation between inhibition of SV-Luc genomic translation and eIF4G proteolysis was found (Figure 7(a) and (c)). Therefore, the genomic SV mRNA, as occurs with cellular mRNAs, is translated in a cap-dependent manner, while 26 S mRNA can be translated when the cap-binding protein eIF4E does not form part of the eIF4F complex.

Effect of eIF4G cleavage on the translation of RNAs from a recombinant SV-bearing GFP protein

Next, we wanted to analyse the requirement of intact eIF4G for the translation of SV-GFP RNAs. This SV recombinant expresses a heterologous gene placed under the control of a duplicated late promoter (Figure 1(c)), and produces two types of subgenomic mRNAs. One is the canonical subgenomic mRNA, and another contains the 26 S leader sequence followed by a heterologous

protein-coding sequence (green fluorescent protein; GFP) (Figure 8(a)). To accomplish efficient cleavage of eIF4G, BHK cells were electroporated with EMC IRES-2A; as controls, EMC IRES-2C (Figure 8(d)) or a transcription buffer was used. Cells were infected 2 hpe or 1 hpe before electroporation with *in vitro* synthesized RNAs. Both forms of eIF4G were proteolysed before genomic translation (Figure 8(c), left upper and middle panels) or subgenomic RNA translation (Figure 8(c), right upper and middle panels). When eIF4G was cleaved before SV-GFP infection, the viral late proteins and GFP synthesis were radically inhibited (Figure 8(c), left lower panel). Notably, normal levels of structural protein synthesis occurred when eIF4G was proteolysed immediately before subgenomic translation (Figure 8(c), right lower panel). In this instance, the levels of SV structural proteins or GFP synthesis from SV-GFP were similar, irrespective of the amount of intact eIF4G present in BHK cells (Figure 8(c), right lower panel). These results were reproduced in three independent experiments and indicate that late protein synthesis is hampered in 2A^{Pto}-expressing cells when eIF4G is cleaved before SV-GFP infection by inhibition of genomic RNA translation. However, the translation

of 26 S and the second subgenomic mRNAs occurred in the absence of intact eIF4G when cells were electroporated at 2 hpi. The translation of the two different subgenomic mRNAs points to the relevance of the subgenomic 26 S leader sequence in providing independence for intact eIF4G.

The leader sequence of the subgenomic SV mRNA contains 49 nt from the cap structure until the initiator AUG codon. To map the regions in this sequence that confers high translatability to this mRNA, three deletion variants in the leader sequence placed before the eGFP gene were constructed (Figure 8(b)). The first 11 nt from the 5'-end must remain in the three constructs, because they are necessary for efficient transcription.⁴² Thus, one of the constructs lacks nucleotides 11–31 (SV-GFP Δ 11-31), another lacks nucleotides 31–49 (SV-GFP Δ 31-49) and the third one lacks nucleotides 11–49 (SV-GFP Δ 11-49) (Figure 8(b)). Notably, the synthesis of SV structural proteins was similar in all three SV-GFP variants, but GFP synthesis was decreased significantly in SV-GFP Δ 11-49. The ratio between C and GFP expression diminished about 20–30% from SV-GFP Δ 11-31 and 50–60% from SV-GFP Δ 11-49 compared with SV-GFP or SV-GFP Δ 31-49 (Figure 8(d), lower panel). Curiously, GFP was still synthesized even when a large part of the leader region was deleted (Figure 8(d), lower panel). These results were reproduced in two independent experiments and indicate that only a profound modification of the leader sequence of subgenomic SV mRNA leads to inhibition of GFP translation.

To test the dependence on eIF4G intactness of the different leader deletion variants, BHK cells were infected with SV-GFP Δ 11-49, SV-GFP Δ 11-31 or SV-GFP Δ 31-49 at a multiplicity of 10 pfu/cell. At 2 hpi, cells were electroporated with EMC IRES-2A, EMC IRES-2C or transcription buffer as a control. As shown in Figure 8(d), upper and middle panel), both forms of eIF4G were proteolysed significantly. It is of interest that translation of the different deletion variants occurred even when eIF4G was bisected (Figure 8(d), left panels). This result suggests that the presence of the initial 11 nt suffices to confer eIF4G independence for the translation of the SV subgenomic mRNA.

Discussion

The majority of late viral mRNAs have the ability to be translated under conditions in which host cell protein synthesis is inhibited deeply.⁸ This is the case of the translation of SV subgenomic mRNA. The alphavirus 26 S mRNA contains a particular structure that confers on it a high translatability under conditions that are detrimental for cellular protein synthesis.^{3,4,43} There are at least two sequences that could be involved in this feature. One of them is the untranslated region (UTR) sequence placed at the 5' end. This sequence from SFV confers on chimeric mRNAs that encode

a reported gene, the capacity to be translated in the presence of small amounts of initiation factors.⁴⁴ The UTR sequence of the SV subgenomic mRNA, which contains 49 nt, also provides a good translatability to chimeric mRNAs bearing the GFP gene, as shown here. Another sequence implicated in subgenomic mRNA translatability is included in the C gene. SV subgenomic mRNAs that contain the first 226 nt from the capsid gene are translated tenfold more efficiently than those lacking this sequence.^{3,4} The first 170 nt downstream of the translation initiation codon may be folded into an extensively base-paired structure. This hairpin structure could recruit some initiation factors present at low concentrations; alternatively, it could pause the 40 S ribosome subunit at the AUG initiation codon.⁴ We now provide evidence that, indeed, translation of SV 26 S mRNA does not require the eIF4F complex. For these assays, we have developed two effective protease expression systems to hydrolyse eIF4G. The first one is based on the use of SV replicons or recombinant viable SV to obtain good expression of the proteases in a high percentage of BHK cells. The second system utilizes *in vitro* transcribed mRNAs, which contain the EMCV IRES followed by the poliovirus 2A gene. This mRNA is electroporated into cells, leading to a low level of expression of this protease.

Our present results indicate that the SV subgenomic mRNA can be translated when eIF4G is proteolysed by 2A^{Pro} or HIV-1 PR. These findings suggest that eIF4E, at least when forming part of the eIF4F complex, is not required to initiate SV subgenomic mRNA translation. It has been reported that the interaction between eIF4G and PABP is essential for the correct recruitment and assembly of the translation machinery.⁴⁵ The hydrolysis of eIF4G by these two viral proteases separates the PABP-binding domain in eIF4G impairing its interaction. Moreover, the proteolysis of eIF4G by HIV-1 PR separates the Mnk-1 interaction domain of eIF4G.²⁷ This kinase phosphorylates eIF4E, increasing its cap-binding activity, thus subsequently enhancing cap-dependent translation.⁹

The dependence of cellular mRNA translation on eIF4G is evident when newly formed mRNAs are examined. Once cellular mRNAs are bound to the protein-synthesizing machinery, subsequent initiation events may not require the participation of an intact eIF4F complex.^{28–30} When cellular mRNAs are stripped of ribosomes by inducing the run-off of translation with hypertonic medium, the mRNAs cannot participate in initiation if eIF4G has been proteolysed.³⁰ This is not the case for SV subgenomic mRNA, since it can interact with ribosomes and initiation factors to accomplish the first initiation event when eIF4G has been cleaved. The capacity of the subgenomic mRNA to be translated after eIF4G proteolysis and treatment with hypertonic medium indicates clearly that intact eIF4F is not required to build up the initiation complex directed by this mRNA. Comparison of

the translation of SV genomic and subgenomic mRNAs points to their different ability to participate in translation in cells lacking intact eIF4G. Thus, the finding that protein synthesis directed by SV genomic mRNA is inhibited by about 60–80% when eIF4G is hydrolysed by poliovirus 2A^{Pro}, indicates that genomic RNA is more similar to cellular mRNAs in its translation behaviour than subgenomic mRNA. Moreover, when eIF4G is proteolysed before SV-Luc and SV-GFP infection, the structural SV protein synthesis is blocked, indicating a reduction in non-structural protein synthesis when 2A^{Pro} is co-expressed. These data point to the different behaviour between early and late SV RNAs, as regards the requirement for eIF4G. However, normal levels of structural proteins are synthesized when eIF4G is proteolysed before subgenomic translation. In this instance, the amount of SV C or GFP synthesis from SV-GFP is similar, irrespective of intact eIF4G. The observation that one RNA with a subgenomic leader sequence placed upstream of the GFP gene can be translated efficiently in SV-infected cells when eIF4G is cleaved by 2A^{Pro}, provides evidence that a short sequence could contribute to cap-independent translation.

The findings obtained with SV-GFP deletion variants suggest that there is not an essential region between nucleotides 11 and 49 to be translated when eIF4G was hydrolysed by 2A^{Pro}. However, the absence of the last 38 nt of the leader 26 S sequence diminished GFP expression. In addition, the presence of 42 nt from the luciferase leader sequence after the first 11 nt of SV 26 S mRNA impaired subgenomic mRNA translation severely (unpublished data). These results suggest that it is not just the length but the sequence of nucleotides 11–49 that is important for the efficient expression of GFP from SV-GFP. In this regard, VSV mRNAs also contain short, unstructured 5' UTRs (11–49 nt) and can be translated in the absence of a functional eIF4F complex.³⁷ These features may contribute to the translatability of VSV RNAs and SV subgenomic RNA. Besides, a number of adenovirus late mRNAs contain the so-called tripartite sequence at their 5' ends. In accordance with the findings described here, these capped adenovirus mRNAs are capable of being translated when eIF4G is cleaved by poliovirus infection.^{46–48} The unstructured conformation of the leader region of some adenovirus mRNAs may confer the translation properties of the tripartite sequence.⁴⁹

As occurs with these adenovirus mRNAs, most probably the leader sequence of the 26 S mRNA is not translated by internal initiation. Thus, SV structural proteins are not produced from genomic RNA in the early phase of SV infection.^{7,48,49} Moreover, eIF2 α is phosphorylated by double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) during SV infection. This modification inactivates eIF2 activity, contributing to the inhibition of cellular translation. Under these conditions, SV subgenomic mRNA continues to be translated.⁵⁰ Therefore, the initiation of translation of the

subgenomic SV mRNA could occur by a mechanism that differs from those described for cellular or picornavirus mRNAs.

The fact that SV subgenomic mRNA contains a cap structure raises questions about its participation in its translation. One possible function of the cap structure in this RNA is to increase the RNA stability in cooperation with the poly(A) sequence.⁵¹ The possibility that the small ribosomal subunit interacts with the initiation AUG codon without participation of eIF4E and the cap structure remains open. Therefore, we can distinguish two different strategies followed by animal viruses to originate mRNAs with a high translatability. Both strategies are directed at decreasing the requirement for translation initiation factors. One type of these viral mRNAs corresponds to uncapped, IRES-containing mRNAs that possess long and highly structured 5' UTRs.^{9,52} Another kind of viral mRNA, which is highly translatable, contains capped short and unstructured leader sequences.^{37,49} Further understanding of the mechanism used to assemble the initiation translation complex directed by the SV subgenomic leader sequence may provide clues to help identify the factors that are involved in the discriminatory recognition between cellular and viral mRNAs.

Another point of interest in this work is the evidence that viable recombinant SV that express HIV-1 PR are feasible, particularly when SQ is present. These recombinant viruses induce a clear cytopathic effect and cell rounding, suggesting that the synthesis of HIV-1 PR or poliovirus 2A^{Pro} suffices to provoke this cytotoxic effect. Moreover, in the absence of inhibitor, SV-PR renders lytic plaques with a morphology different from that of wt SV or SV-PR in the presence of the inhibitor. Hence, SV-PR could be employed as a simple and rapid approach to search for inhibitors against-HIV-1 PR or poliovirus 2A^{Pro} in eukaryotic cells.

Materials and Methods

Cell cultures

BHK-21 cells were grown at 37 °C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% (v/v) fetal calf serum (FCS) and non-essential amino acids.

Plasmids

Construction of the SV replicons Rep C and Rep C-6K have been described.^{6,39} Rep C-PR, Rep C-2A and Rep C-2C were made by inserting a PCR product encoding HIV-1 PR, or poliovirus 2A^{Pro} or 2C, respectively, after the sequence of the C gene in the plasmid pH3/2J-C, employed as a shuttle vector using NdeI/BamHI restriction sites.⁴⁰ Next, the fragment between the two sites (AatII/XhoI) was transferred to the same sites in the vector pT7SVwt (wt SV), described previously.⁴⁰ Rep L2A was constructed by inserting the HpaI/ApaI-digested product containing the hybrid sequence from SV and poliovirus obtained by PCR in the same sites of pT7SVwt.

To obtain this PCR product, we designed four oligonucleotides: the first oligonucleotide hybridizes with the HpaI sequence into the SV sequence; the second has the junction sequence between the SV and poliovirus sequences in the opposite direction; the third has a complementary and inverted sequence related to the second oligonucleotide; and the fourth has the carboxyl-terminal sequence of 2A^{Pro}, a stop codon and, next, the sequence for ApaI. We made a PCR using the first two oligonucleotides and pT7SVwt as a template and another PCR using the last two oligonucleotides and the plasmid pSK-L2A as a template.³¹ Then we used a mixture of these products as a template with the oligonucleotides that have the HpaI and ApaI sites.

pToto1101/Luc (SV-Luc) was generously provided by Charles Rice (Rockefeller University, NY).⁴¹ pT7SV-HIV-1 PR (SV-PR) and pT7SV-2A^{Pro} (SV-2A) were generated by inserting a PCR product containing the corresponding protease gene digested with XbaI/BamHI in the same sites of pH3'2J. The subgenomic promoter cassette of pH3'2J1-HIV-1 PR and pH3'2J-2A^{Pro} was inserted into the SV cDNA clone pT7SVwt using the ApaI/XhoI restriction sites. pT7SV-GFP (SV-GFP) was obtained following a similar strategy as for Rep L2A (see above) using ApaI/XbaI restriction sites in pT7SVwt and pEGFP-N1 (Clontech) as a template. The SV-GFP mutants SV-GFPΔ11-49, SV-GFPΔ11-31 and SV-GFPΔ31-49, that contain certain deletions inside the SV subgenomic leader sequence placed before the eGFP gene (nucleotides 11–49, 11–31 or 31–49 respectively), were constructed using specific oligonucleotides and SV-GFP as a template.

pTM1-2A and pTM1-2C have been described.⁵³ Strains BH10 of HIV-1 and pT7(XLD) were used as a template for HIV-1 and poliovirus constructions, respectively.⁵⁴

Transfection of BHK-21 cells

BHK-21 cells were electroporated with *in vitro* synthesized RNAs from the different plasmids. Subconfluent cells were harvested, washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), and resuspended in PBS at a density of about 2.5×10^6 cell/ml. Aliquots (50 μ l) of phage T7 RNA polymerase (Promega) transcription mixture with about 25 μ g of RNA from each different cDNA construct were added to 0.4 ml of cells, and the mixtures were transferred to 2 mm electroporation cuvettes (Bio-Rad). Electroporation was performed at room temperature by two consecutive 1.5 kV, 25 μ F pulses using a Gene Pulser apparatus (Bio-Rad) as described.⁵⁵ Control BHK cells were electroporated with 50 μ l of transcription mixture in PBS. The cells were then diluted in growth medium and seeded onto culture plates. Viral protein synthesis was analysed by metabolic labelling with [³⁵S]Met-Cys, followed by (SDS-PAGE and fluorography. Western blot analysis was carried out using an antibody against SV nsP1 (a gift from V. Stollar, Robert Wood Johnson Medical School, NJ) at 1:1000 dilution. The integrity of translation initiation factors was analysed by Western blot using anti-eIF4GI antisera raised against peptides derived from the N and C-terminal regions of human eIF4GI³¹ at a 1:1000 dilution or with rabbit antisera against the C-terminal region of eIF4GII (a gift from N. Sonenberg, McGill University, Montreal, Canada) at a 1:500 dilution. Goat antiserum against HIV-1 PR was provided by the EU program EVA/MRC Centralised Facility for AIDS Reagents, NIBSC, UK and used at dilution 1:700. The amount of sample loaded in each experiment was tested by Western blotting with

anti-eIF4A at a 1:50 dilution (a gift from Dr H. Trachsel, Institute for Biochemistry and Molecular Biology, University of Berne, Switzerland). Anti-rabbit, anti-mouse and anti-sheep immunoglobulin G antibodies coupled to peroxidase (Pierce) was used at a 1:10,000 dilution.

Viral infections

BHK-21 cells were infected with SV-Luc, SV-PR or SV-GFP at a multiplicity of infection of 10 pfu/cell. After 1 h of adsorption, the medium was removed and culture plates were incubated with fresh DMEM supplemented with 5% FCS. Wild-type SV and recombinants SV-PR, SV-2A, SV-Luc and SV-GFP were titrated in BHK-21 cultures. In the SV-PR titration, saquinavir (SQ) was added at a final concentration of 12 μ M.

Analysis of mRNA by real-time RT-PCR

SV RNA levels in transfected cells were determined by real-time quantitative RT-PCR. For this purpose, total RNA was extracted from 2×10^5 cells at the times indicated in each Figure using the RNeasy commercial kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations. The isolated RNA was resuspended in 30 μ l of nuclease-free water, and 3 μ l was subjected to analysis. Real-time quantitative RT-PCR was performed with the LightCycler thermal cycler system (Roche Diagnostics) using the RNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics) as described by the manufacturer. The primers nSP2-forward (5'-GGAGGGGCTCCAGGCGGACATCG-3') and nSP2-reverse (5'-GCTCCTCTTCTGTATTCTTGGCG-3') were used to quantify the SV genomic RNA. The primers C-forward (5'-GAACGAGGACGGAGATGTCATCG-3') and C-reverse (5'-CAGCGCCACCGAGGACTATCGC-3') were employed to quantify the total SV RNA. Subgenomic SV RNA was calculated as the difference between total SV RNA and SV genomic RNA. These primers were designed to amplify sequences of 250–300 nt to maximize the efficiency of the reaction. RT-PCR was carried out in 20 μ l of LightCycler RNA Master SYBR Green I solution containing 3 mM manganese acetate and a 1 μ M concentration of each primer. RT was performed at 61 °C for 20 min. After that, PCR amplification was initiated with incubation at 95 °C for 2 min, followed by 45 cycles of 95 °C for 5 s, 58 °C for 12 s, and 72 °C for 20 s. Data analysis was done using the Roche Molecular Biochemicals LightCycler software (version 3.3). The specificity of amplification reactions was confirmed by analysing their corresponding melting curves.

Hypertonic medium treatment

To produce the ribosomal run-off from polysomes, 150 mM NaCl was added to cell cultures to reach a final concentration of 300 mM in DMEM, 10% FCS for 2 h. Protein synthesis was then recovered by washing the cells twice with DMEM to remove the excess of NaCl in the culture medium.³⁰ After that, cell monolayers were incubated for 2 h with DMEM supplemented with 10% FCS. Protein synthesis was estimated as described above at the times indicated in the Figure legend.

Measurement of luciferase activity

BHK-21 cells were electroporated with the different *in vitro* synthesized RNAs. Control cells were electroporated with 50 μ l of transcription buffer in PBS.

Then cells were infected with SV-Luc. At different times post-infection, cells were lysed in a buffer containing 0.5% (v/v) Triton X-100, 25mM glycylglycine (pH 7.8) and 1mM dithiothreitol. Luciferase activity was determined using a Monolight 2010 apparatus (Analytical Luminiscence Laboratory) as described.⁵³

Optical microscopy

BHK-21 cells were electroporated with wt SV, SV-PR or SV-2A and grown on glass coverslips in DMEM with 10% FCS. At 16 hpe cells were washed with PBS and fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature. Finally, cells were washed and mounted in Mowiol by inverting the coverslip. They were examined by microscopy using an Axiovert 200 inverted microscope (Zeiss) with a 20×0.6 Plan-Apochromat Ph2 objective.

Acknowledgements

This study was supported by grants from DGICYT (number BMC2003-00494), CAM (number 07B/0010/2002) and an Institutional Grant awarded to the Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" by the Fundación Ramón Areces. We are grateful to EU program EVA/MRC Centralised Facility for AIDS Reagents, NIBSC, UK for providing anti-HIV-1PR antibody. A.C. is the holder of an FPI Fellowship.

Supplementary Data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.jmb.2005.11.024](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.024)

References

- Schlesinger, S. & Schlesinger, M. J. (2001). Togaviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology* (Knipe, D. M. & Howley, P.M., eds), 4th edn., pp. 895–916, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Strauss, J. H. & Strauss, E. G. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.* **58**, 491–562.
- Frolov, I. & Schlesinger, S. (1994). Translation of Sindbis virus mRNA: effects of sequences downstream of the initiating codon. *J. Virol.* **68**, 8111–8117.
- Frolov, I. & Schlesinger, S. (1996). Translation of Sindbis virus mRNA: analysis of sequences downstream of the initiating AUG codon that enhance translation. *J. Virol.* **70**, 1182–1189.
- Skoging, U. & Liljestrom, P. (1998). Role of the C-terminal tryptophan residue for the structure-function of the alphavirus capsid protein. *J. Mol. Biol.* **279**, 865–872.
- Sanz, M. A., Madan, V., Carrasco, L. & Nieva, J. L. (2003). Interfacial domains in Sindbis virus 6 K protein. Detection and functional characterization. *J. Biol. Chem.* **278**, 2051–2057.
- Frolov, I. & Schlesinger, S. (1994). Comparison of the effects of Sindbis virus and Sindbis virus replicons on host cell protein synthesis and cytopathogenicity in BHK cells. *J. Virol.* **68**, 1721–1727.
- Kean, K. M. (2003). The role of mRNA 5'-noncoding and 3'-end sequences on 40S ribosomal subunit recruitment, and how RNA viruses successfully compete with cellular mRNAs to ensure their own protein synthesis. *Biol. Cell*, **95**, 129–139.
- Prevot, D., Darlix, J. L. & Ohlmann, T. (2003). Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol. Cell*, **95**, 141–156.
- Schneider, R. J. & Mohr, I. (2003). Translation initiation and viral tricks. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 130–136.
- Mader, S., Lee, H., Pause, A. & Sonenberg, N. (1995). The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol. Cell Biol.* **15**, 4990–4997.
- Imataka, H. & Sonenberg, N. (1997). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Mol. Cell Biol.* **17**, 6940–6947.
- Korneeva, N. L., Lamphear, B. J., Hennigan, F. L., Merrick, W. C. & Rhoads, R. E. (2001). Characterization of the two eIF4A-binding sites on human eIF4G-1. *J. Biol. Chem.* **276**, 2872–2879.
- Korneeva, N. L., Lamphear, B. J., Hennigan, F. L. & Rhoads, R. E. (2000). Mutually cooperative binding of eukaryotic translation initiation factor (eIF) 3 and eIF4A to human eIF4G-1. *J. Biol. Chem.* **275**, 41369–41376.
- Imataka, H., Gradi, A. & Sonenberg, N. (1998). A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J.* **17**, 7480–7489.
- Le, H., Tanguay, R. L., Balasta, M. L., Wei, C. C., Browning, K. S., Metz, A. M. *et al.* (1997). Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 16247–16255.
- Tarun, S. Z., Jr & Sachs, A. B. (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.* **15**, 7168–7177.
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J. & Poncet, D. (1998). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* **17**, 5811–5821.
- Aragon, T., de la Luna, S., Novoa, I., Carrasco, L., Ortin, J. & Nieto, A. (2000). Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol. Cell Biol.* **20**, 6259–6268.
- Cuesta, R., Xi, Q. & Schneider, R. J. (2000). Adenovirus-specific translation by displacement of kinase Mnk1 from cap-initiation complex eIF4F. *EMBO J.* **19**, 3465–3474.
- Martinez-Salas, E., Ramos, R., Lafuente, E. & Lopez de Quinto, S. (2001). Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *J. Gen. Virol.* **82**, 973–984.
- Alvarez, E., Menendez-Arias, L. & Carrasco, L. (2003). The eukaryotic translation initiation factor 4GI is cleaved by different retroviral proteases. *J. Virol.* **77**, 12392–12400.

23. Gradi, A., Svitkin, Y. V., Imataka, H. & Sonenberg, N. (1998). Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 11089–11094.
24. Lamphear, B. J., Kirchweger, R., Skern, T. & Rhoads, R. E. (1995). Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J. Biol. Chem.* **270**, 21975219–21975283.
25. Lamphear, B. J., Yan, R., Yang, F., Waters, D., Liebig, H. D., Klump, H. *et al.* (1993). Mapping the cleavage site in protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma of the 2A proteases from human Coxsackievirus and rhinovirus. *J. Biol. Chem.* **268**, 19200–19203.
26. Ohlmann, T., Prevot, D., Decimo, D., Roux, F., Garin, J., Morley, S. J. & Darlix, J. L. (2002). *In vitro* cleavage of eIF4GI but not eIF4GII by HIV-1 protease and its effects on translation in the rabbit reticulocyte lysate system. *J. Mol. Biol.* **318**, 9–20.
27. Ventoso, I., Blanco, R., Perales, C. & Carrasco, L. (2001). HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 12966–12971.
28. Irurzun, A., Sanchez-Palomino, S., Novoa, I. & Carrasco, L. (1995). Monensin and nigericin prevent the inhibition of host translation by poliovirus, without affecting p220 cleavage. *J. Virol.* **69**, 7453–7460.
29. Keiper, B. D. & Rhoads, R. E. (1997). Cap-independent translation initiation in *Xenopus* oocytes. *Nucl. Acids Res.* **25**, 395–402.
30. Novoa, I. & Carrasco, L. (1999). Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4G by exogenously added hybrid proteins containing poliovirus 2Apro in HeLa cells: effects on gene expression. *Mol. Cell Biol.* **19**, 2445–2454.
31. Aldabe, R., Feduchi, E., Novoa, I. & Carrasco, L. (1995). Efficient cleavage of p220 by poliovirus 2Apro expression in mammalian cells: effects on vaccinia virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**, 928–936.
32. Perales, C., Carrasco, L. & Ventoso, I. (2003). Cleavage of eIF4G by HIV-1 protease: effects on translation. *FEBS Letters*, **533**, 89–94.
33. Aldabe, R., Feduchi, E., Novoa, I. & Carrasco, L. (1995). Expression of poliovirus 2Apro in mammalian cells: effects on translation. *FEBS Letters*, **377**, 1–5.
34. Barco, A., Feduchi, E. & Carrasco, L. (2000). A stable HeLa cell line that inducibly expresses poliovirus 2A(pro): effects on cellular and viral gene expression. *J. Virol.* **74**, 2383–2392.
35. Hassett, D. E., Lewis, J. I., Xing, X., DeLange, L. & Condit, R. C. (1997). Analysis of a temperature-sensitive vaccinia virus mutant in the viral mRNA capping enzyme isolated by clustered charge-to-alanine mutagenesis and transient dominant selection. *Virology*, **238**, 391–409.
36. Mulder, J., Robertson, M. E., Seamons, R. A. & Belsham, G. J. (1998). Vaccinia virus protein synthesis has a low requirement for the intact translation initiation factor eIF4F, the cap-binding complex, within infected cells. *J. Virol.* **72**, 8813–8819.
37. Connor, J. H. & Lyles, D. S. (2002). Vesicular stomatitis virus infection alters the eIF4F translation initiation complex and causes dephosphorylation of the eIF4E binding protein 4E-BP1. *J. Virol.* **76**, 10177–10187.
38. Hinton, T. M., Ross-Smith, N., Warner, S., Belsham, G. J. & Crabb, B. S. (2002). Conservation of L and 3C proteinase activities across distantly related aphthoviruses. *J. Gen. Virol.* **83**, 3111–3121.
39. Madan, V., Sanz, M. A. & Carrasco, L. (2005). Requirement of the vesicular system for membrane permeabilization by Sindbis virus. *Virology*, **332**, 307–315.
40. Sanz, M. A. & Carrasco, L. (2001). Sindbis virus variant with a deletion in the 6K gene shows defects in glycoprotein processing and trafficking: lack of complementation by a wild-type 6K gene in trans. *J. Virol.* **75**, 7778–7784.
41. Bick, M. J., Carroll, J. W., Gao, G., Goff, S. P., Rice, C. M. & MacDonald, M. R. (2003). Expression of the zinc-finger antiviral protein inhibits alphavirus replication. *J. Virol.* **77**, 11555–11562.
42. Levis, R., Schlesinger, S. & Huang, H. V. (1990). Promoter for Sindbis virus RNA-dependent subgenomic RNA transcription. *J. Virol.* **64**, 1726–1733.
43. Garry, R. F. (1994). Sindbis virus-induced inhibition of protein synthesis is partially reversed by medium containing an elevated potassium concentration. *J. Gen. Virol.* **75**, 411–415.
44. Berben-Bloemheugel, G., Kasperaitis, M. A., van Heugten, H., Thomas, A. A., van Steeg, H. & Voorma, H. O. (1992). Interaction of initiation factors with the cap structure of chimeric mRNA containing the 5'-untranslated regions of Semliki Forest virus RNA is related to translational efficiency. *Eur. J. Biochem.* **208**, 581–587.
45. Kahvejian, A., Svitkin, Y. V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M. N. & Sonenberg, N. (2005). Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts *via* multiple mechanisms. *Genes Dev.* **19**, 104–113.
46. Castrillo, J. L. & Carrasco, L. (1987). Adenovirus late protein synthesis is resistant to the inhibition of translation induced by poliovirus. *J. Biol. Chem.* **262**, 7328–7334.
47. Dolph, P. J., Racaniello, V., Villamarin, A., Palladino, F. & Schneider, R. J. (1988). The adenovirus tripartite leader may eliminate the requirement for cap-binding protein complex during translation initiation. *J. Virol.* **62**, 2059–2066.
48. Schneider, R. J. (1995). Cap-independent translation in adenovirus infected cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **203**, 117–129.
49. Dolph, P. J., Huang, J. T. & Schneider, R. J. (1990). Translation by the adenovirus tripartite leader: elements which determine independence from cap-binding protein complex. *J. Virol.* **64**, 2669–2677.
50. Gorchakov, R., Frolova, E., Williams, B. R., Rice, C. M. & Frolov, I. (2004). PKR-dependent and -independent mechanisms are involved in translational shut-off during Sindbis virus infection. *J. Virol.* **78**, 8455–8467.
51. Decker, C. J. & Parker, R. (1994). Mechanisms of mRNA degradation in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 336–340.

52. Lopez de Quinto, S. & Martinez-Salas, E. (2000). Interaction of the eIF4G initiation factor with the aphthovirus IRES is essential for internal translation initiation *in vivo*. *RNA*, **6**, 1380–1392.
53. Ventoso, I. & Carrasco, L. (1995). A poliovirus 2A(pro) mutant unable to cleave 3CD shows inefficient viral protein synthesis and transactivation defects. *J. Virol.* **69**, 6280–6288.
54. van der Werf, S., Bradley, J., Wimmer, E., Studier, F. W. & Dunn, J. J. (1986). Synthesis of infectious poliovirus RNA by purified T7 RNA polymerase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **83**, 2330–2334.
55. Liljestrom, P. & Garoff, H. (1991). Internally located cleavable signal sequences direct the formation of Semliki Forest virus membrane proteins from a polyprotein precursor. *J. Virol.* **65**, 147–154.

Edited by J. Karn

(Received 2 August 2005; received in revised form 28 October 2005; accepted 9 November 2005)
Available online 28 November 2005

HIV protease cleaves poly(A)-binding protein

Enrique ÁLVAREZ¹, Alfredo CASTELLÓ, Luis MENÉNDEZ-ARIAS and Luis CARRASCO

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

The PABP [poly(A)-binding protein] is able to interact with the 3' poly(A) tail of eukaryotic mRNA, promoting its translation. Cleavage of PABP by viral proteases encoded by several picornaviruses and caliciviruses plays a role in the abrogation of cellular protein synthesis. We report that infection of MT-2 cells with HIV-1 leads to efficient proteolysis of PABP. Analysis of PABP integrity was carried out in BHK-21 (baby-hamster kidney) and COS-7 cells upon individual expression of the protease from several members of the *Retroviridae* family, e.g. MoMLV (Moloney murine leukaemia virus), MMTV (mouse mammary tumour virus), HTLV-I (human T-cell leukaemia virus type I), SIV (simian immunodeficiency virus), HIV-1 and HIV-2. Moreover, protease

activity against PABP was tested in a HeLa-cell-free system. Only MMTV, HIV-1 and HIV-2 proteases were able to cleave PABP in the absence of other viral proteins. Purified HIV-1 and HIV-2 proteases cleave PABP1 directly at positions 237 and 477, separating the two first RNA-recognition motifs from the C-terminal domain of PABP. An additional cleavage site located at position 410 was detected for HIV-2 protease. These findings indicate that some retroviruses may share with picornaviruses and caliciviruses the capacity to proteolyse PABP.

Key words: eukaryotic initiation factor (eIF), HIV, poly(A)-binding protein (PABP), protease, translation.

INTRODUCTION

The initiation of translation is a multistep process, being a major regulatory target for translational control in animal-virus-infected cells. In the early steps of translation, the 5' cap structure of the mRNA is recognized by the eIF4F (eukaryotic initiation factor 4F) complex. eIF4F also binds to the small ribosome subunit by its interaction with eIF3 forming the 48 S complex. Then, the small ribosomal subunit migrates along the 5'-UTR (untranslated region) until an AUG initiation codon is encountered in a favourable context. The eIF4F complex is composed of three polypeptides: the cap-binding protein eIF4E, the ATP-dependent RNA helicase eIF4A and the scaffolding protein eIF4G [1]. Another motif recognized by the translation machinery in the mRNA is the poly(A) tail, which is achieved by means of the PABP [poly(A)-binding protein]. In addition, PABP interacts with the N-terminal domain of eIF4G, promoting the circularization of the mRNA [2,3]. The eIF4G–PABP interaction may induce several changes in the translation initiation complex that increase the affinity of eIF4E for the cap structure [4]. In this regard, simultaneous interactions between the 5' cap structure and the 3' poly(A) tail of the mRNA synergistically stimulate translation, both *in vitro* and *in vivo* [5,6]. In human cells, there are three types of PABPs, with several isoforms encoded by different genes and with different localizations and functions: cytoplasmic PABPs (PABPC group), nuclear PABPs (PABPN group) and X-linked PABPs. Cytoplasmic PABPs are highly conserved proteins that contain two domains linked by an unstructured region that is rich in proline and methionine residues: an N-terminal domain with four conserved RRM (RNA-recognition motifs) and a C-terminal helical domain that is not required for RNA recognition, but is essential for PABP oligomerization and for the interaction with several regulatory proteins

that are implicated in deadenylation of the poly(A) tail and the initiation and termination of translation [7,8]. PABP interacts with translation initiation factors such as eIF4G and eIF4B [5,9,10], with eRF3 (eukaryotic release factor 3) [11–13], and with two regulatory proteins termed Paip1 and Paip2 (PABP-interacting proteins 1 and 2), which are implicated in the regulation of translation [14,15].

Animal viruses have evolved mechanisms to manipulate the host's translational machinery in order to maximize efficient viral mRNA translation and facilitate the selective translation of viral mRNA. For example, in picornavirus-infected cells, the proteolytic cleavage of eIF4G by rhinovirus or poliovirus 2A^{pro} (2A protease) or by the aptovirus protease L inhibits translation of capped cellular mRNAs [16]. In contrast, translation of the uncapped picornavirus RNA that occurs by a cap-independent mechanism involving the IRES (internal ribosome entry site) is not affected by eIF4G hydrolysis. This mechanism is not exclusive to some picornaviruses. Retroviral genomic RNAs are capped at their 5' ends and contain a 3' poly(A) tail. However, retroviral RNAs have a relatively long 5'-UTR, and the presence of stable secondary structures between the cap and the initiation codon has been proposed to strongly interfere with the scanning mechanism that operates during the initiation of translation [17]. Interestingly, IRES elements have been found in several retroviruses, including HIV-1, and their effects promoting cap-independent translation of retroviral genomic RNAs have been demonstrated [18]. In addition, recent reports have shown that eIF4G is cleaved by the proteases of several members of the family *Retroviridae*, including MMTV (mouse mammary tumour virus), MoMLV (Moloney murine leukaemia virus), HTLV-I (human T-cell leukaemia virus type I), SIV (simian immunodeficiency virus), HIV-1 and HIV-2 [19,20]. The hydrolysis of eIF4G leads to the inhibition of

Abbreviations used: 2A^{pro}, 2A protease; 3C^{pro}, 3C protease; BHK-21, baby-hamster kidney; CA, capsid protein; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's Medium; dpi, days post-infection; eIF, eukaryotic initiation factor; eRF, eukaryotic release factor; GST, glutathione S-transferase; hpe, hours post-electroporation; hpt, hours post-transfection; HTLV-I, human T-cell leukaemia virus type I; IRES, internal ribosome entry site; MBP, maltose-binding protein; MMTV, mouse mammary tumour virus; MOI, multiplicity of infection; MoMLV, Moloney murine leukaemia virus; NSP3, non-structural protein 3; PABP, poly(A)-binding protein; Paip, PABP-interacting protein; pfu, plaque-forming units; RRM, RNA-recognition motif; SIV, simian immunodeficiency virus; SQ, saquinavir; SV, Sindbis virus; SV-2A, SV that expresses poliovirus 2A^{pro}; SV-PR, SV that expresses the HIV-1 protease in the absence of other HIV-1 proteins; UTR, untranslated region.

¹ To whom correspondence should be addressed at the present address: Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain (email ealvarez@cnb.uam.es).

cap-dependent translation without affecting IRES-driven protein synthesis [19,20].

PABP plays an important role in translation, and it is not surprising that certain viruses have developed mechanisms to target this protein to abrogate cellular translation. Rotavirus NSP3 (non-structural protein 3) interacts with the N-terminal region of eIF4G, replacing PABP. This interaction leads to the shut-off of cellular protein synthesis, whereas viral mRNA translation remains unaffected by circularization via NSP3 interaction with the 3'-UTR of viral transcripts [21]. Several reports have shown that PABP is cleaved by 2A^{pro} and 3C^{pro} (3C protease) during enterovirus infection [22–24]. Poliovirus 2A^{pro} bisects PABP, while poliovirus 3C^{pro} cleaves this factor at three sites separating its C-terminal and N-terminal domains. It has been proposed that the removal of the C-terminal domain inhibits cellular translation without affecting binding of the N-terminal domain of PABP to the poly(A) tail and eIF4G [25]. A similar strategy has recently been described in caliciviruses, in which the 3C-like protease, like poliovirus 3C^{pro}, cleaves PABP during infection [26]. In the present paper, we provide evidence showing that retroviral proteases such as those from MMTV, HIV-1 and HIV-2 are able to hydrolyse PABP.

EXPERIMENTAL

Plasmids and *in vitro* transcription

The plasmids pT7SV-HIV-1PR and pT7SV-2A^{pro} and pT7SVwt were described previously [27].

The pTM1-derived plasmids containing the protease-coding regions of several retroviruses were described in detail earlier [19,20]. The pTM1-Luc plasmid, which contains the luciferase gene, and the plasmid pTM1-2A^{pro} have also been described previously [28,29].

The plasmid pGEX-2T-PABP1 containing the sequence encoding the human PABP1, lacking the first nine amino acids and fused to the GST (glutathione S-transferase) gene, was obtained as described previously [30] and was kindly provided by Dr Amelia Nieto, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid, Spain.

Capped genomic SV (Sindbis virus) mRNAs were synthesized *in vitro* using the T7 RNA polymerase kit (Promega). Plasmids used as DNA templates in these assays were linearized with XhoI.

Cell culture, virus infection and transfection

MT-2 cells were grown in RPMI 1640 containing 10% (v/v) foetal calf serum. MT-2 cells were infected with HIV-1 (NL3.4 strain) using an MOI (multiplicity of infection) of approx. 1 pfu (plaque-forming unit)/cell, and, at 3 dpi (days post-infection), cells were lysed in sample buffer as described previously [29]. HIV-1-infected cells were provided by Dr Balbino Alarcón, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, CSIC-UAM, Madrid, Spain.

BHK-21 (baby-hamster kidney) cells were electroporated with 30 µg of recombinant SV genomic RNAs in final volume of 50 µl as described in [27]. Electroporated cells were grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) containing 10% (v/v) foetal calf serum and non-essential amino acids, and, at 8 hpe (hours post-electroporation), cells were lysed in sample buffer.

COS-7 cells were grown in DMEM containing 10% (v/v) foetal calf serum and non-essential amino acids. Coupled infection/DNA transfection of COS-7 cells with recombinant vaccinia virus (vvT7) and pTM1-derived plasmids have been described in detail previously [28]. Transfection efficiencies were determined by immunofluorescence using a luciferase antiserum (Promega) after transfecting the cells with the plasmid pTM1-Luc as described previously [19].

Western blotting

Proteins were transferred on to a 0.45-µm-pore-size nitrocellulose membrane (Bio-Rad) for Western blot analysis. Western blots were developed with the following antibodies: mouse monoclonal anti-PABP antibody (Abcam) at a 1:250 dilution; eIF4GI antisera raised against peptides derived from the N- and C-terminal regions of the human eIF4GI [28] at a 1:1000 dilution; rabbit antisera raised against the C-terminal region of eIF4GII (a gift from Professor Nahum Sonenberg, McGill University, Montréal, Québec, Canada) at 1:500 dilution; hybridoma supernatant of a monoclonal antibody against eIF4A factor at a 1:50 dilution (a gift from Professor Dr Hans Trachsel, Institute for Biochemistry and Molecular Biology, University of Berne, Berne, Switzerland) and mouse ascites of a monoclonal antibody against HIV-1 p24 antigen (Centralised Facility for AIDS Reagents, NIBSC, Potters Bar, Herts., U.K.) was used at a 1:100 dilution. Goat anti-(rabbit IgG) antibody coupled to peroxidase and goat anti-(mouse IgG) antibody coupled to peroxidase (Pierce) were used at a 1:10000 dilution.

Protein purification

HIV-1 protease was purchased from the Centralised Facility for AIDS Reagents. Purified HIV-2 protease [31] was obtained through the NIH (National Institutes of Health) AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases), NIH, Bethesda, MD, U.S.A., from Dr Bret Shirley and Mr Michael Cappola (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals). MoMLV protease was expressed and purified as described previously [32]. The chimaeric MBP (maltose-binding protein)–2A^{pro} was purified by affinity chromatography, as described previously [33]. The pGEX-2T-PABP1 plasmid was used to purify the GST–PABP1 fusion protein by affinity chromatography, using a glutathione–agarose 4B resin (Amersham Biosciences) as described previously [30].

Protease cleavage assays

To detect PABP processing by HIV proteases in cell-free systems, crude HeLa S10 extracts were incubated with 2.5 ng/µl of recombinant HIV-1 protease, HIV-2 protease or MBP–2A^{pro}, and, at the indicated times, reactions were stopped by adding sample buffer. Lysates were analysed by SDS/PAGE and Western blotting. Degradation kinetics of translation factors were determined by densitometric scanning of the protein band corresponding to each factor analysed using a GS-710 calibrated Imagin Densitometer (Bio-Rad). In order to map the cleavage sites of HIV-1 protease and HIV-2 protease on PABP, 50 µg of recombinant GST–PABP1 protein were incubated with 1 µg of recombinant HIV-1 protease or HIV-2 protease in a total volume of 200 µl for 3 h at 30 °C in a buffer containing 50 mM sodium phosphate, pH 6.0, 25 mM NaCl, 5 mM EDTA and 1 mM DTT. Cleavage products were separated by SDS/PAGE, transferred to an Immobilon PVDF membrane (Bio-Rad) and then subjected to automated Edman degradation with an Applied Biosystems Procise Sequencer in the Proteomics Service of Centro de Investigaciones Biológicas CSIC.

RESULTS

Cleavage of PABP in HIV-1-infected cells

The hydrolysis of both PABP and eIF4G could contribute to the drastic shut-off of host translation in poliovirus-infected cells. In order to investigate the susceptibility of PABP to proteolysis

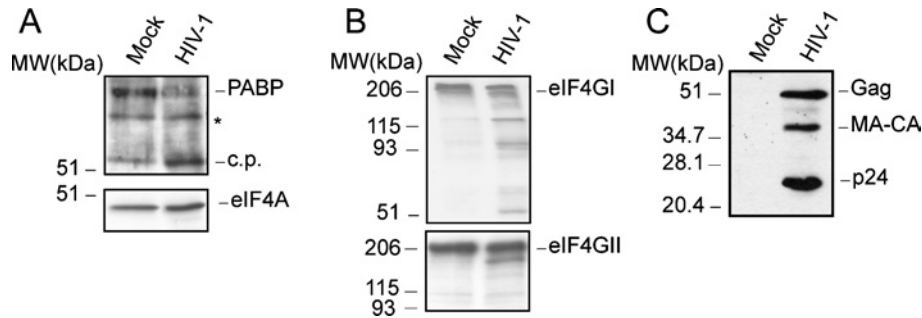


Figure 1 PABP cleavage in HIV-1-infected cells

(A) MT-2 cells were infected with HIV-1 (at an MOI of 1). At 3 dpi, the integrity of PABP was determined by Western blotting (upper panel; 10% gel). The corresponding Western blot against eIF4A is shown in the lower panel (10% gel). Mock, mock-infected cells; HIV-1, cells infected with HIV-1; c.p., cleavage product derived from PABP in infected cells; MW, molecular mass (sizes given in kDa). An unknown anti-PABP-reactive band is also denoted by an asterisk. (B) Western blots against eIF4GI (upper panel) and eIF4GII (lower panel) at 3 dpi (7.5% gel). (C) Western blot against the HIV-1 CA, p24 at 3 dpi (15% gel). The position of the intact initiation factors is also indicated in the respective panel.

after HIV-1 infection, MT-2 cells were infected with HIV-1 at a multiplicity of approx. 1 pfu/cell. The integrity of PABP was assessed by Western blotting at 3 dpi using PABP antiserum (Figure 1A, upper panel). Proteolytic cleavage of PABP was clearly apparent in MT-2 cells infected with HIV-1. Thus intact PABP decreased considerably, while a smaller immunoreactive protein band with a molecular mass of approx. 53 kDa appeared. To analyse the integrity of other initiation factors, these samples were blotted using antibodies against eIF4GI, eIF4GII and eIF4A (Figure 1). The amount of eIF4A remained constant after infection, indicating that this protein was not modified by HIV-1 and that similar amounts of proteins were loaded in all cases (Figure 1A, lower panel). Cleavage of eIF4GI was detected in MT-2 infected-cells, using antibodies that recognize epitopes at the N-terminal or C-terminal regions of the initiation factor. (Figure 1B). Hydrolysis of eIF4GI was estimated to be approx. 50–60%. In agreement with previous reports, eIF4GII was much less affected by HIV-1 infection [20]. Finally, the activity of HIV-1 protease in infected cells was also tested by Western blotting using p24 antiserum (Figure 1C). The Gag (p55) precursor was processed to CA-MA (capsid-matrix intermediate product) and to CA (capsid protein; p24) by HIV-1 protease.

HIV-1 protease cleaves PABP

Next, the ability of HIV-1 protease to cleave PABP was tested when this protease was expressed alone in culture cells. For this purpose, the HIV-1 protease-coding region within the *pol* gene was placed under the control of a duplicated late promoter in a SV construct in order to generate a recombinant SV that expresses the HIV-1 protease in the absence of other HIV-1 proteins (SV-PR) [27]. In addition, the poliovirus 2A gene was cloned using a similar strategy to generate a recombinant SV that expresses poliovirus 2A^{pro} (SV-2A) [27]. The transcribed RNAs corresponding to wild-type SV, SV-PR and SV-2A were electroporated in BHK-21 cells, and the integrity of PABP was examined at 8 hpe (Figure 2A). The expression of HIV-1 protease led to over 60% cleavage of PABP, a result similar to that found after expression of poliovirus 2A^{pro}. A polypeptide of approx. 53 kDa, which could be a proteolytic product of PABP, was detected in cells electroporated with SV-PR RNA. This band has only been detected sporadically, and in low abundance, in overexposed immunoblots, but it is identical in size with those observed in HIV-1-infected cells. Moreover, cleavage products were not detected in cells expressing the poliovirus 2A^{pro}, most probably due to the small amount of proteolytic products which are not well detected by the

monoclonal antibody against PABP. In this regard, in a previous report, PABP cleavage products could not be detected using this antibody either in poliovirus-infected cells or in cell-free systems [22]. The decrease of PABP induced by expression of HIV-1 protease was abolished when 12 μ M SQ (saquinavir), a specific inhibitor of the HIV protease, was present (Figure 2A). Furthermore, the 53 kDa cleavage product was not detectable in SV-PR-expressing cells when SQ was present (Figure 2A). Cell extracts were analysed further to determine the cleavage of eIF4GI and eIF4GII (Figures 2B and 2C). Previous findings revealed the presence of two forms of eIF4G of 220 and 150 kDa in BHK-21 cells [27,28]. These different eIF4G forms may be the result of post-translational modifications. The 150 kDa product may be a breakdown product of eIF4GI. Both polypeptides of 220 and 150 kDa are absent from cells that express 2A^{pro} and HIV-1 protease. In agreement with our results reported previously, the expression of HIV-1 protease induces an effective cleavage of eIF4GI, while eIF4GII remained intact (Figures 2B and 2C) [19,20]. The kinetics of the hydrolysis of PABP, eIF4GI and eIF4GII by HIV-1 protease were analysed after electroporation of BHK-21 cells (Figure 2D). The cleavage of PABP by HIV-1 protease was similar to that observed with eIF4GI proteolysis. In addition, cleavage of eIF4GII by HIV-1 protease was very inefficient in this assay.

Other retroviral proteases cleave PABP in transfected cells

The susceptibility of PABP to proteolysis mediated by different retroviral proteases encoded by MoMLV, MMTV, HTLV-I, SIV, HIV-1 and HIV-2 was tested in transfected cells. For this purpose, the pTMI-derived plasmids containing the corresponding retroviral protease-coding sequences were transfected in COS-7 cells with the vaccinia virus vvT7 system. Poliovirus 2A^{pro} was expressed in parallel to serve as a control of PABP cleavage. The integrity of PABP was assessed by Western blot at 16 hpt (hours post-transfection) (Figure 3A). Expression of HIV-1, HIV-2 and MMTV protease induced a substantial decrease in intact PABP comparable with that obtained after transfection of poliovirus 2A^{pro}. Cleavage products of PABP were not detected by Western blot analysis in these cells, in a similar fashion to that observed in cells electroporated with SV-2A mRNA. The addition of 2 μ M SQ prevented the loss of PABP caused by HIV-1 and HIV-2 proteases, suggesting that the lower level of intact PABP in HIV protease-transfected cells was due to their proteolytic activity. On the other hand, a decrease in PABP was not detectable in cells transfected with plasmids containing the retroviral

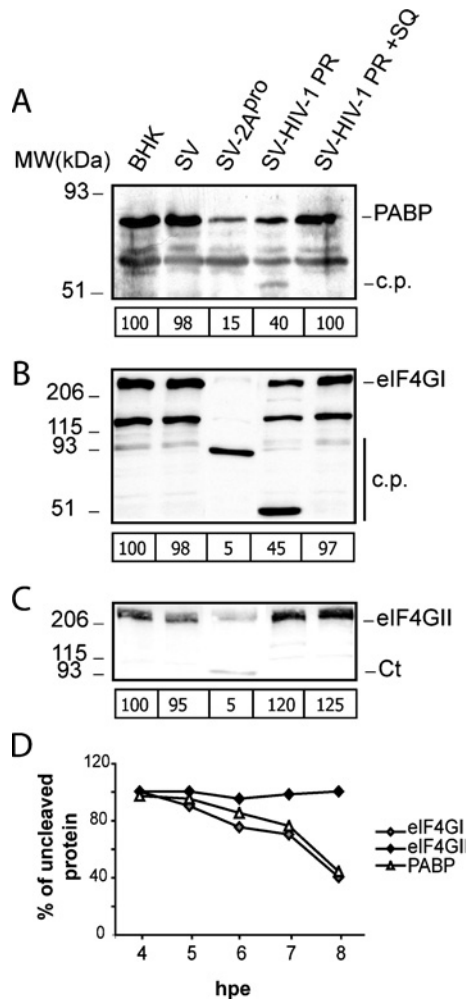


Figure 2 Cleavage of PABP in cells electroporated with recombinant SVs that express heterologous proteases

(A) Cells were electroporated with transcription buffer (BHK), or wild-type SV (SV), SV-PR or SV-2A RNA and were incubated in the presence or absence of 12 μ M SQ. At 8 hpe, cell extracts were analysed by Western blotting using specific antibodies against human PABP1 (10% gel). c.p., cleavage product derived from PABP in SV-PR-infected cells; MW, molecular mass (sizes given in kDa). The relative amount of intact PABP for each transfection experiment is indicated below each corresponding lane. (B) Detection of eIF4GI cleavage products by Western blotting using a mixture of antisera against its N- and C-terminal regions (7.5% gel). c.p., cleavage fragments. The amount of intact eIF4GI for each transfection experiment is indicated below each corresponding lane. (C) Detection of eIF4GII cleavage products by Western blotting using an antiserum against the C-terminal region (7.5% gel). Ct, C-terminal fragments of eIF4GII. The amount of intact eIF4GII for each transfection experiment is indicated below each lane. (D) Cleavage kinetics of PABP, eIF4GI and eIF4GII by HIV-1 protease. BHK-21 cells were electroporated as described in the Experimental section, and cell lysates were obtained at the indicated times. The values were obtained by densitometric scanning of the corresponding intact protein band at each time indicated.

protease-coding regions of MoMLV, HTLV-I and SIV. The integrity of eIF4GI and eIF4GII was also analysed in protease-transfected cells (Figures 3B and 3C). In agreement with previous data, all retroviral proteases were able to cleave eIF4GI (Figure 3B), while the proteases of MMTV, MoMLV, HTLV-I and SIV cleaved eIF4GII in transfected cells (Figure 3C). The efficiency of transfection in these experiments was approx. 70%, as determined by immunofluorescence of cells transfected with the pTM1-Luc plasmid, using a luciferase antiserum (results not shown).

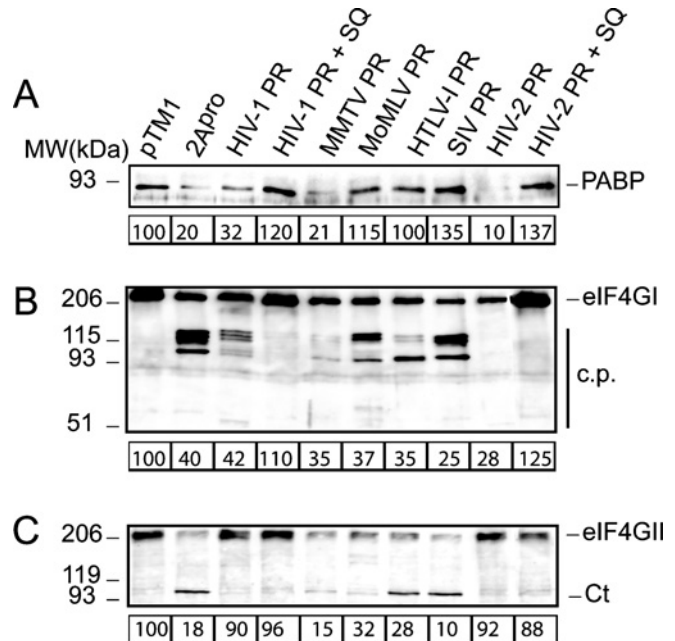


Figure 3 Cleavage of PABP, eIF4GI and eIF4GII in transfected cells

(A) COS-7 cells were transfected with the empty pTM1 vector or with pTM1 carrying inserts containing the protease gene of several retroviruses or poliovirus 2A^{pro}. At 16 hpt, equal amounts of protein extract were loaded in a polyacrylamide gel and analysed by Western blotting using a monoclonal antibody against PABP (10% gel). Data are referred to control experiments carried out with the empty pTM1 vector, and the values were obtained by densitometric scanning of the protein band of approx. 70 kDa corresponding to PABP. (B) Western blot against eIF4GI (7.5% gel). (C) Western blot against eIF4GII (7.5% gel). The estimated amount of intact protein in cell extracts obtained from transfections with different constructs is indicated below each panel. MW, molecular mass (sizes are given in kDa); c.p., cleavage fragments; Ct, C-terminal fragments of eIF4GII.

In vitro cleavage of PABP by HIV-1 and HIV-2 proteases

The proteolysis of PABP was studied further in cell-free systems using purified recombinant proteases from HIV-1, HIV-2 and MoMLV. The recombinant MBP-2A^{pro} was included as a control. HeLa cell extracts were incubated for 90 min at 30 °C with 3 ng/ μ l of each purified protease. Under the experimental conditions used, complete proteolytic processing of intact PABP by HIV-1 and HIV-2 proteases occurs, while some intact PABP still remains upon incubation with MBP-2A^{pro} (Figure 4A). This result indicates that the purified HIV-1 and HIV-2 proteases hydrolyse PABP more efficiently than MBP-2A^{pro}. On the other hand, the MoMLV protease was unable to cleave PABP in this assay. The specificity of these cleavages was evidenced by using an HIV-1 protease inhibitor such as SQ, which blocked cleavage of PABP1 by both HIV-1 and HIV-2 proteases (Figure 4A). Consistent with the above results, the purified HIV-1 and HIV-2 proteases proteolysed eIF4GI *in vitro*, while eIF4GII was very inefficiently degraded by both proteases (results not shown). In addition, the integrity of other initiation factors, such as eIF4E, eIF4A and the 100 kDa subunit of eIF3, was analysed (Figure 4B, bottom, middle and top panels respectively). The amount of these translation factors remained constant after incubation with recombinant HIV-1 and HIV-2 proteases.

To analyse the kinetics of proteolysis of PABP, eIF4GI and eIF4GII, HeLa cell extracts were incubated with recombinant HIV-1 protease and HIV-2 protease, and, at the indicated times, the reactions were stopped (Figures 5A and 5B). As observed with SV-PR in culture cells, the kinetics of cleavage of PABP by HIV-1 and HIV-2 proteases were very similar to those observed for

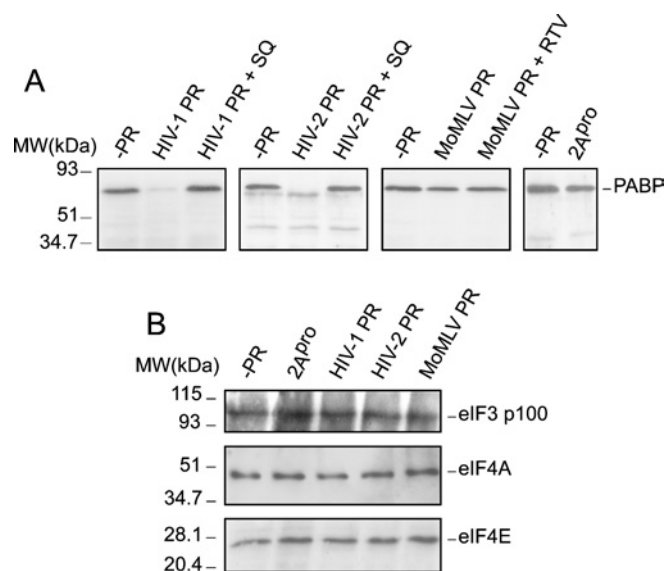


Figure 4 Cleavage of PABP *in vitro* by purified recombinant HIV-1, HIV-2 and MoMLV proteases

Crude HeLa S10 extracts (50 μ g) were incubated with 3 ng/ μ l of each recombinant protease in a total volume of 20 μ l for 90 min and subjected to Western blotting analysis by using: (A) a monoclonal antibody against PABP (10% gel); (B) a polyclonal antiserum against the 100 kDa subunit of eIF3 (top panel; 10% gel), an antibody against eIF4A (middle panel; 15% gel) or a monoclonal antibody raised against eIF4E (bottom panel; 15% gel). MW, molecular mass (sizes given in kDa).

eIF4GI (Figures 5C and 5D). Consistent with previous observations using HIV-1 and HIV-2 proteases [19,20], hydrolysis of eIF4GII does not occur with the retroviral proteases throughout the assay.

Identification of the cleavage sites of HIV-1 and HIV-2 proteases on PABP

To determine whether the cleavage of HIV-1 and HIV-2 proteases on PABP was the result of a direct or indirect activation of cellular proteases, the fusion protein GST-PABP1-(9–636) was incubated with the recombinant HIV-1, HIV-2 and MoMLV proteases. In some assays, 2 μ M SQ (in the case of HIV-1 protease or HIV-2 protease) and 20 μ M ritonavir (in the case of MoMLV protease) were added. The staining of SDS/polyacrylamide gels with Coomassie Brilliant Blue revealed the generation of several cleavage products (Figure 6A). Incubation of GST-PABP1-(9–636) with both HIV-1 protease and HIV-2 protease revealed a similar degradation pattern, but with some slight differences (Figure 6A). Cleavage of GST-PABP1 by HIV-1 and HIV-2 proteases was inhibited by addition of 2 μ M SQ. In addition, the purified MoMLV protease was unable to cleave the recombinant GST-PABP1 under the conditions used in this assay (Figure 6A).

In order to identify precisely the proteolysis sites, the cleavage products were sequenced by the Edman degradation method. N-terminal sequencing of the polypeptides of approx. 27 and 20 kDa rendered FERHED, which corresponds to a cleavage site located between positions 237 and 238 of PABP1 (Figure 6B). Sequencing analysis of the 18 kDa polypeptide rendered a serine, threonine, glutamine, arginine, valine and alanine in sequencing cycles 1–6, which correspond to the cleavage site located at positions 477/478 of PABP1. In addition, AAIPQT was identified as the N-terminal sequence of the approx. 8 kDa fragment detected

after incubation of GST-PABP1 with HIV-2 protease, which reveals a processing site located between positions 410 and 411 of PABP1 (Figure 6B). Edman degradation of polypeptides of approx. 72 and 52 kDa rendered a sequence that correspond with the six first amino acids of GST (Figure 6A, denoted by asterisks). These findings reflect that both HIV-1 and HIV-2 proteases cleave PABP1 around the same sites (Figure 6C). The presence of additional cleavage sites on PABP1, such as the cleavage site located at position 410/411, could also explain in part the variability observed among the degradation products rendered by HIV-1 and HIV-2 proteases. The relative conservation of the PABP1 cleavage sites of viral proteases supports the view that this protein is a genuine substrate for the HIV-1 and HIV-2 proteases.

DISCUSSION

A variety of viral products are responsible for cell damage that occurs during virus infection. Animal viruses encode proteases that cleave polyprotein precursors to render the mature viral proteins. Apart from those substrates, a number of host proteins are also cleaved by viral proteases. The hydrolysis of the host proteins alters different cellular functions. Thus proteases of several viruses cleave protein factors of the cellular translational machinery, causing a down-regulation of cellular mRNA translation, while increasing the synthesis of viral proteins. Thus cleavage of the initiation factor eIF4G by proteases of several picornaviruses leads to the inhibition of translation directed by cellular capped mRNAs [16]. Moreover, bisection of eIF4G by picornavirus proteases enhances the translation of the virus mRNA genome that contains an IRES motif at its 5' end. Previous reports have shown that eIF4G is also a target of retroviral proteases [19,20]. In some retroviruses, including HIV-1, viral-protease-mediated cleavage of eIF4G leads to the inhibition of cap-dependent translation, without affecting the IRES-driven protein synthesis directed by retroviral mRNAs [19,20,34].

Previous reports have shown that PABP is also cleaved by the proteases of several picornaviruses and caliciviruses during infection [22–24,26]. Its degradation, together with the cleavage of eIF4G, contribute to the observed inhibition of cellular translation that occurs during viral infection. The cleavage of PABP by the poliovirus 3C^{pro} occurs at the C-terminal domain of the protein. As a result, the C-terminal portion, which is implicated in interaction with other proteins, is separated from the RNA-interacting N-terminal domain [24]. This cleavage may selectively inhibit poly(A)-dependent translation [24,25]. The C-terminal domain of PABP interacts with several proteins that are implicated in mRNA translation (i.e. eIF4B and eRF3) [5,9–13]. The cleavage of PABP by 3C^{pro} disrupts its interaction with eIF4B and eRF3, probably affecting late events in translation, such as ribosome recycling. Our results show that HIV proteases also cleaved PABP within its C-terminal domain. The identified cleavage sites (at positions 410–411 and 477–478) were relatively close to those recognized by poliovirus 3C^{pro}. In addition, HIV proteases also hydrolyse PABP between residues 237 and 238. This cleavage leads to the removal of the first two RRM (RRM1 and RRM2) of PABP, which may retain some of the functions of the protein.

All of the RRM of PABP possess RNA-binding ability [35], although the first two domains together (RRM1–RRM2) are the ones with the highest affinity for the poly(A) tail [36]. RRM2 is involved in direct interaction with eIF4G [9,37]. It has been shown that translation can be rescued in PABP-depleted Krebs-2 cell extracts by the addition of purified recombinant PABP fragments such as RRM1–RRM2 or RRM1–RRM4, although less efficiently than with intact PABP [38]. These observations suggested that the

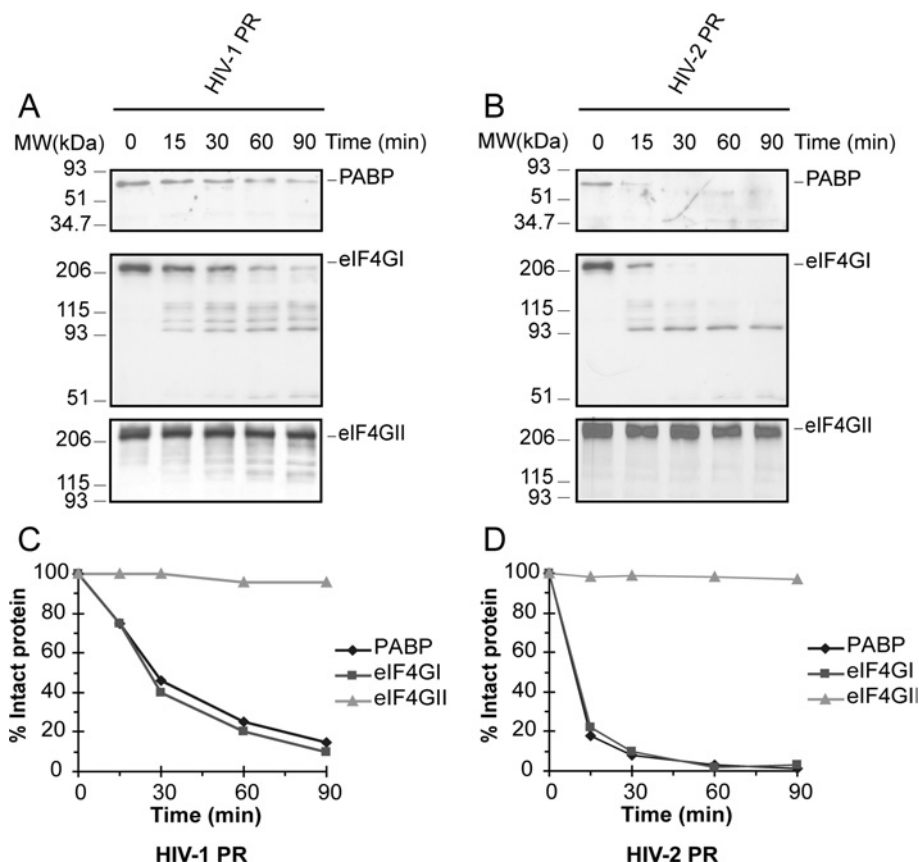


Figure 5 Cleavage kinetics of PABP, eIF4GI and eIF4GII *in vitro* by purified recombinant HIV-1 and HIV-2 proteases

Crude HeLa S10 extracts (50 μ g) were incubated with 3 ng/ μ l HIV-1 protease (**A**) or HIV-2 protease (**B**) in a total volume of 20 μ l during the indicated times and subjected to Western blot analysis by using a monoclonal antibody against PABP (top panel; 10% gel), a mixture of antisera against N-terminal and C-terminal regions of eIF4GI (middle panel; 7.5% gel) or an antiserum against the C-terminal region of eIF4GII (bottom panel; 7.5% gel). Degradation kinetics of PABP, eIF4GI and eIF4GII in HeLa cell extracts incubated with HIV-1 protease (**C**) and HIV-2 protease (**D**). Determinations were obtained by densitometric scanning of the corresponding intact protein band at the indicated times. MW, molecular mass (sizes given in kDa).

interaction of PABP and eIF4G is essential for efficient translation, although additional interactions of the C-terminal domain of PABP with other factors would be necessary for a complete stimulation of translation [38]. In agreement with that proposal, cleavage of PABP within RRM3 by HIV protease may abolish in part, but not completely, the function of its N-terminal domain, since the RRM1–RRM2 region still retains the eIF4G-binding site and the ability to bind RNA.

Infection of C8166 cells by HIV-1 led to a drastic decline in host translation coincident with the decrease of intact eIF4GI [20]. However, total proteolysis of eIF4GI is not sufficient to block translation of cellular mRNAs engaged in the translational machinery [39,40]. The shut-off of host protein synthesis is coincident with the hydrolysis of eIF4GII in poliovirus- and rhinovirus-infected cells, as well as in apoptotic cells [41,42]. PABP hydrolysis by poliovirus 3C^{pro} inhibits completely the translation of endogenous mRNAs in HeLa cell extracts [25]. Our present findings indicate that cleavage of both eIF4GI and PABP occur with similar kinetics in cell culture and in a cell-free system, suggesting that PABP proteolysis may also contribute to host cell translation inhibition and could be responsible for the shut-off of host protein synthesis, observed in some cell lines upon HIV-1 infection [20]. In HIV-1-infected cells, the correlation observed between eIF4GI hydrolysis and the inhibition of cellular protein synthesis could be attributed to the viral-protease cleavage of both eIF4GI and PABP.

Interestingly, retroviral proteases such as those from MoMLV, HTLV-I or SIV-1 are able to hydrolyse eIF4GI and eIF4GII, but not PABP, while inhibiting protein synthesis in transfected COS-7 cells [19]. Although both HIV-1 and HIV-2 proteases are able to proteolyse eIF4GI and PABP very efficiently, eIF4GII remains a poor substrate of both enzymes [19,20]. Taken together, available data suggest that, at least two of those factors must be inactivated to efficiently inhibit cap- and poly(A)-dependent translation of cellular mRNAs.

Apart from factors implicated in translation, other host proteins have been identified as substrates of HIV proteases and the potential role of cleavage of cellular proteins in the cytotoxic effect inflicted by HIV has been pointed out by several laboratory groups [43,44]. Examples of cell proteins cleaved by HIV proteases are microtubule-associated proteins, cytoskeletal proteins and nuclear factor- κ B, among others [45,46]. Nevertheless, further investigations are required to define the precise role of each of those proteolytic cleavages in the cytopathogenicity provoked by HIV infection.

It is widely accepted that most retroviruses do not affect cellular protein synthesis after infection. This is not the case for HIV, which blocks cellular protein synthesis more or less efficiently depending on the viral strain and cell line analysed [47,48]. In HIV-1, the Vpr protein blocks proliferation of CD4⁺ T-cells at the G₂ cell-cycle checkpoint [18,49]. At this stage, the initiation of cap-dependent translation is suppressed, probably due to the

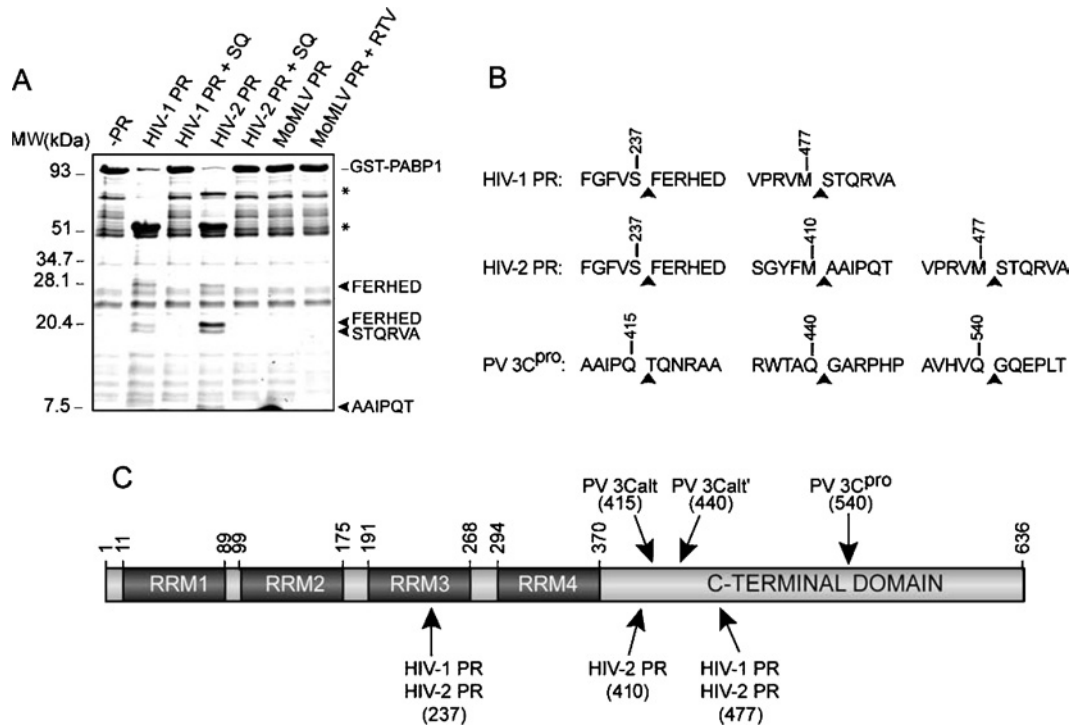


Figure 6 Identification of HIV-1 protease and HIV-2 protease cleavage sites on PABP1

(A) Recombinant GST-PABP1 protein (5 μ g) was incubated with 100 ng of recombinant HIV-1 protease, HIV-2 protease or MoMLV protease in a total volume of 20 μ l as described in the Experimental section. Cleavage products were separated by SDS/17% PAGE, and the hydrolysis fragments were stained with Coomassie Brilliant Blue. The sequenced polypeptides are indicated with an arrowhead. Bands corresponding to GST N-terminal polypeptides are denoted by asterisks. MW, molecular mass (sizes given in kDa). (B) Amino acid sequence of the PABP1 cleavage sites identified using HIV-1 and HIV-2 proteases. (C) Diagram showing the functional domains found in PABP1 based on the available data, including the position of mapped cleavage sites for HIV-1 and HIV-2 proteases. The RRMs and the regions involved in the binding to other translation factors are shown. Sequence numbering refers to the human PABP1 isoform. RTV, ritonavir.

cleavage of both eIF4GI and PABP, while the initiation of IRES-containing mRNAs ensures Gag and Gag-Pol synthesis. In this scenario, cleavage of both PABP and eIF4GI could facilitate viral gene expression, while contributing to the inhibition of host protein synthesis. The finding that many retroviral and picornaviral proteases target eIF4G, and, in some cases, PABP, indicates that those viruses may share a common mechanism of translational control.

Financial support from Grant BMC2003-00494 from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica and an Institutional Grant to the Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" from the Fundación Ramón Areces, are acknowledged. E.A. and A.C. hold fellowships from the Ministerio de Educación y Ciencia.

REFERENCES

- Hentze, M. W. (1997) eIF4G: a multipurpose ribosome adapter? *Science* **275**, 500–501
- Jacobson, A. and Favreau, M. (1983) Possible involvement of poly(A) in protein synthesis. *Nucleic Acids Res.* **11**, 6353–6368
- Jacobson, A. (1996) Poly(A) metabolism and translation: the closed loop model. In *Translational Control* (Hershey, J. W. B., Mathews, M. B. and Sonenberg, N., eds.), pp. 451–480. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Borman, A. M., Michel, Y. M. and Kean, K. M. (2000) Biochemical characterisation of cap-poly(A) synergy in rabbit reticulocyte lysates: the eIF4G–PABP interaction increases the functional affinity of eIF4E for the capped mRNA 5'-end. *Nucleic Acids Res.* **28**, 4068–4075
- Tarun, Jr, S. Z., Wells, S. E., Deardorff, J. A. and Sachs, A. B. (1997) Translation initiation factor eIF4G mediates *in vitro* poly(A) tail-dependent translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 9046–9051
- Gallie, D. R. (1991) The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev.* **5**, 2108–2116
- Adam, S. A., Nakagawa, T., Swanson, M. S., Woodruff, T. K. and Dreyfuss, G. (1986) mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2932–2943
- Sachs, A. B., Bond, M. W. and Kornberg, R. D. (1986) A single gene from yeast for both nuclear and cytoplasmic polyadenylate-binding proteins: domain structure and expression. *Cell* **45**, 827–835
- Imataka, H., Gradi, A. and Sonenberg, N. (1998) A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J.* **17**, 7480–7489
- Le, H., Tanguay, R. L., Balasta, M. L., Wei, C. C., Browning, K. S., Metz, A. M., Goss, D. J. and Gallie, D. R. (1997) Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 16247–16255
- Hoshino, S., Imai, M., Kobayashi, T., Uchida, N. and Katada, T. (1999) The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-poly(A) tail of mRNA: direct association of eRF3/GSPT with polyadenylate-binding protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 16677–16680
- Kozlov, G., Trempe, J. F., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., Ekiel, I. and Gehring, K. (2001) Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 4409–4413
- Cosson, B., Couturier, A., Chabelskaya, S., Kiktev, D., Inge-Vechtomov, S., Philippe, M. and Zhouravleva, G. (2002) Poly(A)-binding protein acts in translation termination via eukaryotic release factor 3 interaction and does not influence [PSI⁺] propagation. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3301–3315
- Craig, A. W., Haghghat, A., Yu, A. T. and Sonenberg, N. (1998) Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature (London)* **392**, 520–523
- Khaleghpour, K., Svitkin, Y. V., Craig, A. W., DeMaria, C. T., Deo, R. C., Burley, S. K. and Sonenberg, N. (2001) Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. *Mol. Cell* **7**, 205–216
- Prevot, D., Darlix, J. L. and Ohlmann, T. (2003) Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol. Cell* **95**, 141–156

- 17 Baudin, F., Marquet, R., Isel, C., Darlix, J. L., Ehresmann, B. and Ehresmann, C. (1993) Functional sites in the 5' region of human immunodeficiency virus type 1 RNA form defined structural domains. *J. Mol. Biol.* **229**, 382–397
- 18 Brasey, A., Lopez-Lastra, M., Ohlmann, T., Beerens, N., Berkhout, B., Darlix, J. L. and Sonenberg, N. (2003) The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G₂/M phase of the cell cycle. *J. Virol.* **77**, 3939–3949
- 19 Alvarez, E., Menendez-Arias, L. and Carrasco, L. (2003) The eukaryotic translation initiation factor 4G1 is cleaved by different retroviral proteases. *J. Virol.* **77**, 12392–12400
- 20 Ventoso, I., Blanco, R., Perales, C. and Carrasco, L. (2001) HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 12966–12971
- 21 Piron, M., Vende, P., Cohen, J. and Poncet, D. (1998) Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* **17**, 5811–5821
- 22 Joachims, M., Van Breugel, P. C. and Lloyd, R. E. (1999) Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation *in vitro*. *J. Virol.* **73**, 718–727
- 23 Kerekatte, V., Keiper, B. D., Badorff, C., Cai, A., Knowlton, K. U. and Rhoads, R. E. (1999) Cleavage of Poly(A)-binding protein by coxsackievirus 2A protease *in vitro* and *in vivo*: another mechanism for host protein synthesis shutoff? *J. Virol.* **73**, 709–717
- 24 Kuyumcu-Martinez, N. M., Joachims, M. and Lloyd, R. E. (2002) Efficient cleavage of ribosome-associated poly(A)-binding protein by enterovirus 3C protease. *J. Virol.* **76**, 2062–2074
- 25 Kuyumcu-Martinez, N. M., Van Eden, M. E., Younan, P. and Lloyd, R. E. (2004) Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1779–1790
- 26 Kuyumcu-Martinez, M., Belliot, G., Sosnovtsev, S. V., Chang, K. O., Green, K. Y. and Lloyd, R. E. (2004) Calicivirus 3C-like proteinase inhibits cellular translation by cleavage of poly(A)-binding protein. *J. Virol.* **78**, 8172–8182
- 27 Castelló, A., Sanz, M. A., Molina, S. and Carrasco, L. (2006) Translation of sindbis virus 26S mRNA does not require intact eukaryotic initiation factor 4G. *J. Mol. Biol.* **355**, 942–956
- 28 Aldabe, R., Feduchi, E., Novoa, I. and Carrasco, L. (1995) Efficient cleavage of p220 by poliovirus 2A^{pro} expression in mammalian cells: effects on vaccinia virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**, 928–936
- 29 Ventoso, I., Barco, A. and Carrasco, L. (1998) Mutational analysis of poliovirus 2A^{pro}: distinct inhibitory functions of 2A^{pro} on translation and transcription. *J. Biol. Chem.* **273**, 27960–27967
- 30 Burgui, I., Aragon, T., Ortin, J. and Nieto, A. (2003) PABP1 and eIF4G1 associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J. Gen. Virol.* **84**, 3263–3274
- 31 Rittenhouse, J., Turon, M. C., Helfrich, R. J., Albrecht, K. S., Weigl, D., Simmer, R. L., Mordini, F., Erickson, J. and Kohlbrenner, W. E. (1990) Affinity purification of HIV-1 and HIV-2 proteases from recombinant *E. coli* strains using pepstatin-agarose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 60–66
- 32 Menendez-Arias, L., Gotte, D. and Oroszlan, S. (1993) Moloney murine leukemia virus protease: bacterial expression and characterization of the purified enzyme. *Virology* **196**, 557–563
- 33 Ventoso, I., Barco, A. and Carrasco, L. (1999) Genetic selection of poliovirus 2A^{pro}-binding peptides. *J. Virol.* **73**, 814–818
- 34 Perales, C., Carrasco, L. and Ventoso, I. (2003) Cleavage of eIF4G by HIV-1 protease: effects on translation. *FEBS Lett.* **533**, 89–94
- 35 Deo, R. C., Bonanno, J. B., Sonenberg, N. and Burley, S. K. (1999) Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell* **98**, 835–845
- 36 Burd, C. G., Matunis, E. L. and Dreyfuss, G. (1991) The multiple RNA-binding domains of the mRNA poly(A)-binding protein have different RNA-binding activities. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3419–3424
- 37 Kessler, S. H. and Sachs, A. B. (1998) RNA recognition motif 2 of yeast Pab1p is required for its functional interaction with eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 51–57
- 38 Kahvejian, A., Svitkin, Y. V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M. N. and Sonenberg, N. (2005) Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev.* **19**, 104–113
- 39 Perez, L. and Carrasco, L. (1992) Lack of direct correlation between p220 cleavage and the shut-off of host translation after poliovirus infection. *Virology* **189**, 178–186
- 40 Irurzun, A., Sanchez-Palomino, S., Novoa, I. and Carrasco, L. (1995) Monensin and nigericin prevent the inhibition of host translation by poliovirus, without affecting p220 cleavage. *J. Virol.* **69**, 7453–7460
- 41 Gradi, A., Svitkin, Y. V., Imataka, H. and Sonenberg, N. (1998) Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 11089–11094
- 42 Svitkin, Y. V., Gradi, A., Imataka, H., Morino, S. and Sonenberg, N. (1999) Eukaryotic initiation factor 4GII (eIF4GII), but not eIF4GI, cleavage correlates with inhibition of host cell protein synthesis after human rhinovirus infection. *J. Virol.* **73**, 3467–3472
- 43 Shoeman, R. L., Honer, B., Stoller, T. J., Kesselmeier, C., Miedel, M. C., Traub, P. and Graves, M. C. (1990) Human immunodeficiency virus type 1 protease cleaves the intermediate filament proteins vimentin, desmin, and glial fibrillary acidic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 6336–6340
- 44 Tomasselli, A. G., Hui, J. O., Adams, L., Chosay, J., Lowery, D., Greenberg, B., Yem, A., Deibel, M. R., Zurcher-Neely, H. and Heinrikson, R. L. (1991) Actin, troponin C, Alzheimer amyloid precursor protein and pro-interleukin 1 β as substrates of the protease from human immunodeficiency virus. *J. Biol. Chem.* **266**, 14548–14553
- 45 Dunn, B. M. (1998) Human immunodeficiency virus 1 retropepsin. In *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Barret, A. J., Rawlings, N. D. and Woessner, J. F., eds.), pp. 919–928, Academic Press, London
- 46 Wlodawer, A. and Gustchina, A. (2000) Structural and biochemical studies of retroviral proteases. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 16–34
- 47 Agy, M. B., Wambach, M., Foy, K. and Katze, M. G. (1990) Expression of cellular genes in CD4 positive lymphoid cells infected by the human immunodeficiency virus, HIV-1: evidence for a host protein synthesis shut-off induced by cellular mRNA degradation. *Virology* **177**, 251–258
- 48 Somasundaran, M. and Robinson, H. L. (1988) Unexpectedly high levels of HIV-1 RNA and protein synthesis in a cytotoxic infection. *Science* **242**, 1554–1557
- 49 Goh, W. C., Rogel, M. E., Kinsey, C. M., Michael, S. F., Fultz, P. N., Nowak, M. A., Hahn, B. H. and Emerman, M. (1998) HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr *in vivo*. *Nat. Med.* **4**, 65–71

Received 16 January 2006/1 March 2006; accepted 2 March 2006

Published as BJ Immediate Publication 2 March 2006. doi:10.1042/BJ20060108

Differential Cleavage of eIF4GI and eIF4GII in Mammalian Cells

EFFECTS ON TRANSLATION*[‡]

Received for publication, May 5, 2006, and in revised form, August 11, 2006. Published, JBC Papers in Press, September 7, 2006, DOI 10.1074/jbc.M604340200

Alfredo Castelló^{‡1}, Enrique Alvarez[§], and Luis Carrasco^{‡2}

From the [‡]Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa,” Facultad de Ciencias and [§]Centro Nacional de Biotecnología Universidad Autónoma, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Two isoforms of the translation initiation factor eIF4G, eIF4GI and eIF4GII, have been described in eukaryotic cells. The exact function of each isoform during the initiation of protein synthesis is still under investigation. We have developed an efficient and reliable method of expressing poliovirus 2Apro, which differentially proteolyzes eIF4GI and eIF4GII in a time- and dose-dependent manner. This system is based on the electroporation of an *in vitro* transcribed mRNA that contains the encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site followed by the sequence of poliovirus 2Apro. In contrast to HeLa cells, expression of this protease in BHK-21 cells induces delayed hydrolysis kinetics of eIF4GI with respect to eIF4GII. Moreover, under these conditions the polyadenylate binding protein is not cleaved. Interestingly, translation of *de novo* synthesized luciferase mRNA is highly dependent on eIF4GI integrity, whereas ongoing translation is inhibited at the same time as eIF4GII cleavage. Moreover, reinitiation of a preexisting mRNA translation after polysome run-off is dependent on the integrity of eIF4GII. Notably, *de novo* translation of heat shock protein 70 mRNA depends little on eIF4GI integrity but is more susceptible to eIF4GII hydrolysis. Finally, translation of an mRNA containing encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site when the two isoforms of eIF4G are differentially hydrolyzed has been examined.

The initiation of translation is a major target for the regulation of gene expression in eukaryotic cells. A number of initiation factors participate in this process leading to the interaction of the small ribosomal subunit with mRNA. The eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F)³ plays a central role in the early steps

of protein synthesis. eIF4F is composed of three polypeptides: eIF4E, eIF4A, and eIF4G (1, 2). eIF4E is the cap binding subunit. eIF4A is an RNA helicase which together with eIF4B unwinds the secondary structure present at the 5' end of mRNAs. eIF4G is a scaffolding protein that physically links the cap structure and the poly(A) tail of mRNAs with the small ribosomal subunit by means of its interaction with eIF4E, poly(A)-binding protein (PABP), and eIF3. In addition, eIF4G interacts with other cellular and viral proteins involved in the regulation of translation (2). There are two isoforms of eIF4G in mammalian cells known as eIF4GI and eIF4GII that are 46% identical in their primary amino acid sequence. It has been proposed that these two isoforms possess similar biochemical activities and are functionally interchangeable (2). eIF4G contains three domains of a similar size: (i) the N-terminal region, which contains the eIF4E and PABP binding sites, which are needed for cap and poly(A) recognition (3, 4); (ii) the middle portion, which participates in the recruitment of the 43S preinitiation complex on interaction with eIF3 (5); (iii) the C-terminal domain, which binds Mnk1, a mitogen-activated protein kinase that enhances cap-dependent translation by phosphorylation of eIF4E (6, 7). Two eIF4A interaction sites have been found in eIF4G, located in the middle and C-terminal domain, respectively (8). Thus, eIF4G is essential for coordinating a number of components of the translation machinery to assemble the initiation complex.

Infection of mammalian cells with most cytolytic animal viruses induces a marked inhibition of host transcription and translation. Many viruses have evolved mechanisms that employ viral proteases to manipulate the host translational machinery to maximize the selective translation of viral mRNAs compared with endogenous host transcripts (9). Although it was found some time ago that picornavirus infection induces a marked shutoff of host protein synthesis, the mechanisms involved are still being investigated. Previous reports revealed that hydrolysis of eIF4GI, which composes most of the total eIF4G (10, 2), is not sufficient to fully inhibit host translation (11–13). Proteolysis kinetics of eIF4GII were delayed with respect to cleavage of eIF4GI in poliovirus (PV)- and human rhinovirus-infected cells. In this regard disappearance of intact eIF4GII correlated with the abrogation of host translation in PV- and rhinovirus-infected and apoptotic cells (14–16). Cleavage of both eIF4GI and eIF4GII strongly blocked the initiation of *de novo* synthesized mRNAs (17). In addition, PV and Coxsackievirus 2A^{PPO} and 3C^{PPO} are able to cleave PABP during infection (10). More recently, it has been reported that

* This study was supported by Dirección general de investigación científica y técnica (DGICT) Grant BMC2003-00494 and an Institutional Grant awarded to the Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” by the Fundación Ramón Areces. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[‡] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. 10–13.

¹ Holder of a FPI fellowship.

² To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-914978450; Fax: 34-914974799; E-mail: lcarrasco@cbm.uam.es.

³ The abbreviations used are: eIF, eukaryotic initiation factor; PV, poliovirus; EMCV, encephalomyocarditis virus; IRES, internal ribosome entry site; Hsp70, heat shock protein 70; PABP, poly(A)-binding protein; Luc, luciferase; VV7, vaccinia virus T7; RT, reverse transcription; hpe, hours post-electroporation; ActD, actinomycin D.

hydrolysis of PABP by 3C^{Pro} in the absence of eIF4G degradation blocks the translation of endogenous mRNAs in HeLa cell extracts (18). 3C^{Pro} preferentially hydrolyzed the PABP associated with the translational machinery, although the hydrolysis of PABP did not correlate with the shutoff of cellular translation in PV-infected cells (10). Therefore, the individual contribution of eIF4GI, eIF4GII, and PABP proteolysis to the shutoff of cellular protein synthesis needs further investigation.

We describe an effective system based on PV 2A^{Pro} that induces the differential cleavage of eIF4GI and eIF4GII without affecting PABP. Hydrolysis of eIF4GI by 2A^{Pro} occurs before proteolysis of eIF4GII in HeLa cells, whereas the opposite is true for BHK cells. The effect of differential degradation of each eIF4G isoform in the translation of cellular mRNAs in culture cells has been examined.

MATERIALS AND METHODS

Cell Cultures—HeLa and BHK-21 (baby hamster kidney) cells were grown at 37 °C in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 5% fetal calf serum and nonessential amino acids. HeLa clone X1/5 cells express luciferase (Luc) in a tetracycline-dependent manner (19, 17). Repression of Luc gene transcription was obtained with 20 ng/ml tetracycline in the culture medium (17).

Plasmids—The plasmids pKs-Luc, pTM1-Luc, pTM1-2C, and pTM1-2A and the plasmids pTM1-2AG60R, pTM1-2AG121E, pTM1-2AD135N, and pTM1-2AV119M, which encodes a PV 2A^{Pro} mutant, have been described previously (20, 21).

RNA Transcription—The *in vitro* transcription was carried out with T7 polymerase (Promega) according to the indications of the manufacturer and the corresponding plasmid as a template. *In vitro* polyadenylation was performed with poly(A) polymerase (Invitrogen). The mRNA was purified using the chroma spin columns kit (BD Biosciences). The amount of mRNA was analyzed with the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer.

Transfection of HeLa and BHK-21 Cells—HeLa cells were electroporated with *in vitro* synthesized mRNAs. Subconfluent cells were harvested, washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), and resuspended in PBS at a density of about 2.5×10^6 cells/ml. Fifty μ l of transcription mixture (Promega) with the amounts of RNA indicated in each figure legend were added to 0.8 ml of cell suspension, and the mixtures were transferred to 4-mm electroporation cuvettes (Bio-Rad). Electroporation was performed at room temperature by one 350-V, 975-microfarad pulse using a Gene Pulser apparatus (Bio-Rad). BHK-21 cells were electroporated as previously described (22). Coupled infection/transfection by vaccinia virus T7/pTM1 system has been described previously (23). Protein synthesis was analyzed by metabolic labeling with 50 μ Ci of [³⁵S]Met-[³⁵S]Cys/ml (Promix; Amersham Biosciences) for 1 h followed by SDS-PAGE, fluorography, and autoradiography. The integrity of translation initiation factors was analyzed by Western blotting with anti-eIF4GI antisera raised against peptides derived from the N- and C-terminal regions of human eIF4GI at a 1:1000 dilution, rabbit antisera raised against the N-terminal and C-terminal region of eIF4GII (a gift from N. Sonenberg, McGill

University, Montreal, Canada) at a 1:500 dilution, and mouse monoclonal anti-PABP antibody (Abcam) at a 1:250 dilution or anti-eIF4A at a 1:50 dilution (a gift from Dr. H. Trachsel, Institute for Biochemistry and Molecular Biology, University of Berne, Switzerland). Heat shock protein 70 (Hsp70) was detected using rabbit anti-Hsp70 antisera at a 1:200 dilution (Santa Cruz). Anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulin G antibodies coupled to peroxidase (Pierce) were used at a 1:10,000 dilution. Percentage of protein synthesis and percentage of intact eIF4G were determined by densitometric scanning of the corresponding protein band.

Analysis of mRNA by Real-time RT-PCR— β -Actin, Luc, and Hsp70 mRNA levels in transfected HeLa cells were determined by real-time quantitative reverse transcription RT-PCR. Total RNA was extracted from 2×10^5 cells at the times indicated in each figure using the RNeasy commercial kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations (22). Analysis of the actin mRNA level was performed using the Hs 99999903-m1 assay, whereas the Hsp70 mRNA level was estimated with the Hs00359163-s1 assay. As a control, 18 S rRNA was measured using the Hs 99999901-m1 assay (Applied Biosystems). In the case of Luc mRNA, primers and probe were designed and provided by Applied Biosystems. The amount of the different mRNAs was determined by taking into consideration the 18 S rRNA levels. RT-PCR was carried out in 20 μ l of reaction mixture containing 0.9 μ M concentrations of each primer and 0.25 μ M TaqMan probe. Reverse transcription was performed at 25 °C for 10 min and 37 °C for 2 h. Afterward, PCR amplification was started by incubation at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min using the ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Data analysis was carried out using the SDS-7000 software (Version 1.1). The corresponding figures were plotted with the 95% confidence intervals from three independent experiments as error bars.

Measurement of Luc Activity—HeLa X1/5 and HeLa cells electroporated with the *in vitro* synthesized Luc mRNAs were lysed in a buffer containing 0.5% Triton X-100, 25 mM glycylglycine (pH 7.8), and 1 mM dithiothreitol at different post-electroporation times. Luc activity was determined using a Monolight 2010 apparatus (Analytical Luminescence Laboratory) as described previously (23). S.D. determined from three independent experiments are indicated as error bars in each figure.

RESULTS

Transfection of HeLa Cells with mRNAs Containing the PV 2A Sequence—We initially constructed a plasmid that encoded for the encephalomyocarditis virus (EMCV) internal ribosome entry site (IRES) followed by the PV 2A^{Pro} sequence (pTM1-2A) (21). *In vitro* transcription from this plasmid leads to the synthesis of EMC-2A mRNA. Electroporation of 9 μ g of this mRNA was sufficient to drastically inhibit translation in HeLa cells accompanied by hydrolysis of eIF4G (Fig. 1, A and B). The cleavage products were similar to those found after transfection of cells with pTM1-2A plasmid and infection with recombinant vaccinia virus T7 but differed from the eIF4G peptides produced by caspase-3 activity in apoptotic cells (data not shown). Notably, PABP remained intact (Fig. 1C), whereas potent hydrolysis was found using this antibody in cells trans-

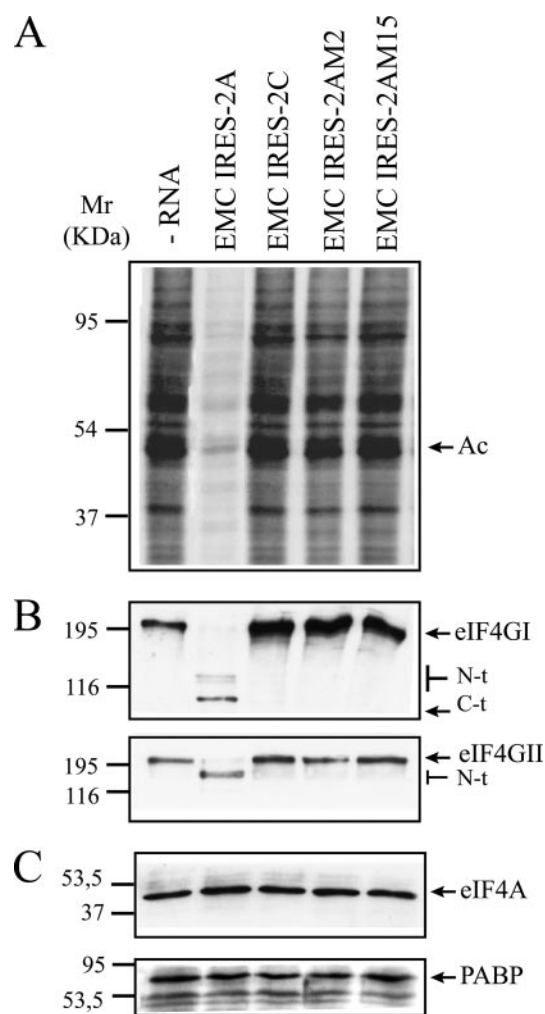


FIGURE 1. Expression of PV 2A^{Pro} in HeLa cells on transfection of EMC-2A mRNA. HeLa cells were electroporated with 9 μ g of EMC-2A, EMC-2C, EMC-2AM2, EMC-2AM15 mRNAs or transcription buffer. Proteins were labeled from 7 to 8 hpe and processed as described under "Materials and Methods." *A*, analysis of protein synthesis. *B*, Western blotting against eIF4GI (upper panel) and eIF4GII (lower panel). *C*, Western blotting against eIF4A (upper panel) and PABP (lower panel). Ac, actin; N-t, N-terminal fragments of eIF4GI or eIF4GII; C-t, C-terminal fragments of eIF4GI or eIF4GII. M_r , molecular weight markers.

ected with pTM1-3C, pTM1-2A, or pTM1-HIV-1PR (24). In this regard, PV 2A^{Pro} exhibited low proteolytic activity against PABP (25, 10). Two lower polypeptides were found in control as well as in 2A^{Pro}-expressing cells. These bands could be endogenous PABP degradation products or proteins that unspecifically immuno-react with the antibody against PABP used (Fig. 1C). Nevertheless, these polypeptides do not disappear in the presence of proteases that specifically hydrolyzed PABP (24). This method yielded low levels of 2A^{Pro}, since this protease was not detected by autoradiography or Western blotting with specific antibodies (data not shown). The IRES region from EMCV confers a high translability to the mRNAs, and so transfection of EMC-2A could compete with cellular mRNAs, leading to the inhibition of host translation. To test this possibility, HeLa cells were transfected with mRNAs that encode for inactive point mutants of PV 2A^{Pro} (M2, G60R; M15, G121E) (21). These mRNAs did not affect the level of host protein synthesis as compared with control cells, and both isoforms of eIF4G

remained intact at 8 h post-electroporation (hpe) (Fig. 1, *A* and *B*). These data suggest that the inhibition of host mRNA translation and the modifications of eIF4G are, indeed, due to the synthesis of PV 2A^{Pro} and not to competition from the transfected mRNAs.

Transfection of HeLa X1/5 Cells with EMC-2A; Effect on Translation of Preexisting and de Novo-synthesized mRNAs—Previous observations have shown that eIF4GI is preferentially hydrolyzed as compared with eIF4GII in PV-infected HeLa cells (14). Our aim was to establish conditions under which these two isoforms were differentially cleaved in the absence of PABP hydrolysis in culture cells. We wanted to analyze the effect of differential eIF4GI and eIF4GII hydrolysis on the initiation of translation of *de novo* synthesized mRNAs as compared with the translation of mRNAs already engaged in the protein synthesis machinery. For this, we used Luc inducible HeLa X1/5 cells (19). These cells were electroporated with different amounts of *in vitro* transcribed EMC-2A mRNA: 1, 2, 4, or 9 μ g. As controls, cells were electroporated with transcription buffer or with 9 μ g of EMC-2C mRNA. During electroporation, tetracycline was removed from the culture medium to trigger Luc mRNA synthesis. Host protein synthesis, Luc expression, integrity of initiation factors, and mRNA levels were analyzed at 4, 6, and 8 hpe (Fig. 2 and supplemental Fig. 10). The 2A^{Pro} expression induced a time- and dose-dependent inhibition of host protein synthesis (Fig. 2A). To ensure that similar amounts of proteins were loaded in each lane of the gel, the level of eIF4A was also estimated (Fig. 2B). eIF4GI and eIF4GII were proteolyzed in a time- and dose-dependent manner. As expected, eIF4GII was cleaved by 2A^{Pro} with delayed kinetics as compared with eIF4GI hydrolysis (Fig. 2B and see Fig. 6C) (14). Interestingly, PABP remained intact during this assay (Fig. 2C). Significant hydrolysis of eIF4GI accompanied by partial cleavage of eIF4GII had only a limited effect on host translation of preexisting mRNAs (Fig. 2, *A* and *B*, *second* and *eighth* lanes). However, extensive inhibition of ongoing protein synthesis was observed when both eIF4G isoforms were hydrolyzed by 2A^{Pro} (Fig. 2, *A* and *B*). Protein synthesis was not shut off by a reduction in the total amount of preexisting mRNAs since significant differences in the level of actin mRNA were not observed in these cells (supplemental Fig. 10). These findings indicate that a strong abrogation of translation of preexisting mRNAs takes place when 2A^{Pro} extensively cleaves both eIF4GI and eIF4GII. Moreover, PABP degradation is not essential for this inhibition to occur.

Luc mRNA translation was measured to analyze the effect on translation of *de novo* synthesized mRNAs when eIF4GI and eIF4GII are differentially hydrolyzed. Synthesis of Luc mRNAs was not significantly affected by the expression of PV 2A^{Pro} (supplemental Fig. 10) (17). Notably, 1 μ g of EMC-2A mRNA sufficed to abrogate Luc mRNA translation (Fig. 2D). This amount of EMC-2A mRNA induced efficient cleavage of eIF4GI but only partially hydrolyzed eIF4GII (Fig. 2B, *second*, *seventh*, and *fourteenth* lanes). These results suggest that translation of *de novo* synthesized mRNAs is more affected by eIF4GI proteolysis than mRNAs engaged in the translation machinery. Because the amounts of actin and Luc mRNAs were similar in transfected cells regardless of the EMC-2A dose

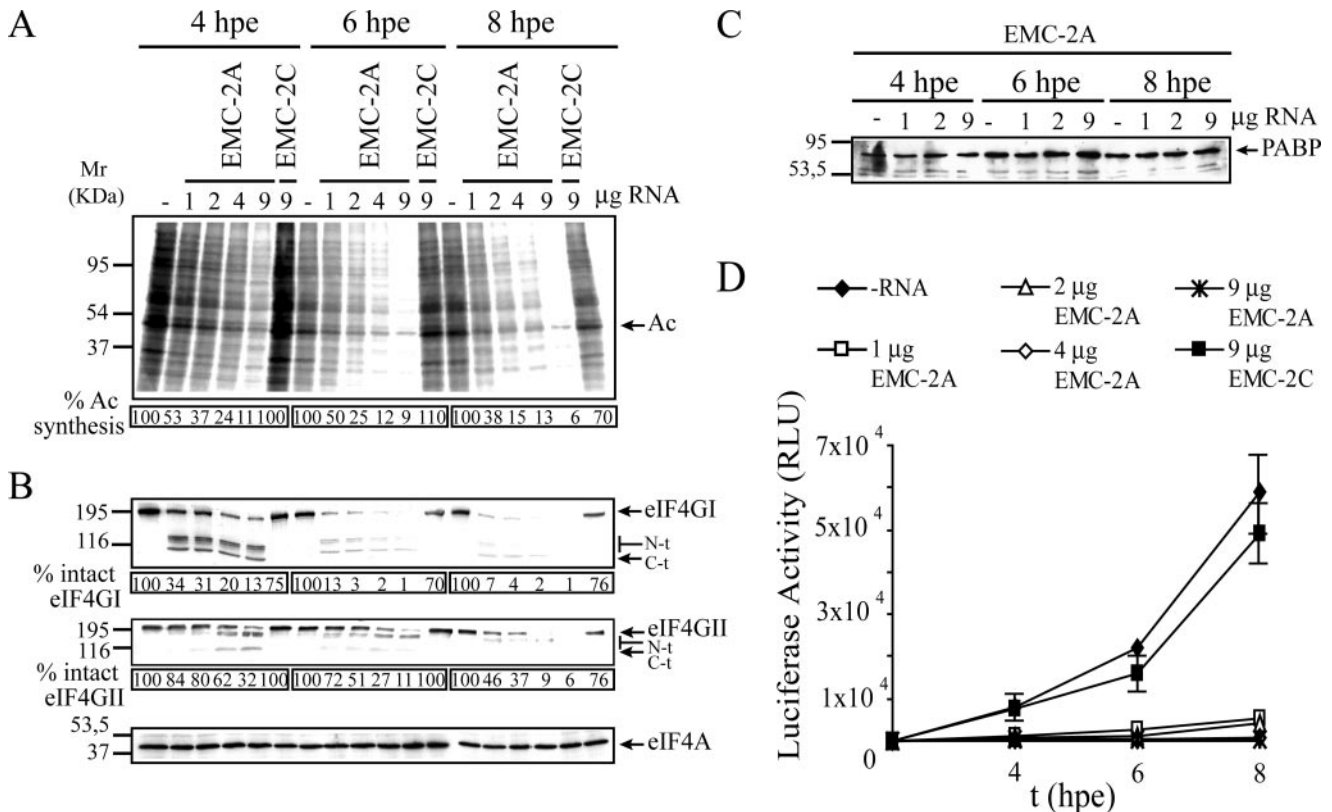


FIGURE 2. Differential hydrolysis of eIF4GI and eIF4GII by PV 2A^{pro}. Effects on translation of preexisting and *de novo* synthesized mRNAs are shown. HeLa X1/5 cells were electroporated with 1, 2, 4, or 9 μg of EMC-2A, 9 μg of EMC-2C, or transcription buffer. One-third of the cells was used to analyze protein synthesis and the integrity of initiation factors. *A*, analysis of protein synthesis. *B*, Western blotting against eIF4GI (upper panel), eIF4GII (middle panel), and eIF4A (lower panel). *C*, Western blotting against PABP. The remaining cells were used to analyze the Luc activity (*D*) and mRNA levels (supplemental Fig. 10). RLU, relative light units.

employed (supplemental Fig. 10), the inhibition of actin or Luc synthesis could not be ascribed to a decrease in the level of these mRNAs.

Translation of *de novo* synthesized Luc mRNA was more dependent on eIF4GI integrity than preexisting actin mRNAs. To determine whether eIF4G is required to translate preexisting Luc mRNA, tetracycline was removed from the culture medium 4 h before electroporation. Thus, Luc mRNA started to be synthesized before transfection of EMC-2A mRNA. Cells were then electroporated with 0.1, 0.5, 1, 3, and 9 μg of EMC-2A, and actinomycin D (ActD), an inhibitor of transcription (26), was immediately added at a final concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Luciferase activity and eIF4G integrity were measured at 0 and 4 hpe in ActD-treated as well as untreated cells (Fig. 3A). eIF4GI was significantly hydrolyzed at 0.1 μg of EMC-2A mRNA. However, eIF4GII was only proteolyzed in cells electroporated with 9 μg of EMC-2A (Fig. 3B). Transfection of 0.1 μg of EMC-2A was sufficient to fully block Luc synthesis in untreated cells, whereas 9 μg of this mRNA was required to inhibit Luc synthesis in ActD treated cells (Fig. 3A). Therefore, hydrolysis of eIF4GI is sufficient to inhibit Luc synthesis in cells that synthesize Luc mRNA continuously. However, hydrolysis of both isoforms of eIF4G is required to fully block Luc mRNA translation when Luc mRNAs were engaged in the translation machinery.

Involvement of eIF4GI and eIF4GII in the Translation of Transfected Luc mRNAs—The next step was to determine the extent of translation of different mRNAs transfected in cells where both isoforms of eIF4G had been differentially cleaved. This was done by co-electroporating HeLa cells with different amounts of EMC-2A and 9 μg of different Luc mRNAs: capped (*cap-Luc*), capped and polyadenylated (*cap-Luc-poly(A)*) (Fig. 4A), uncapped (Luc) or uncapped and polyadenylated (Luc-poly(A)) (supplemental Fig. 11). In this assay PV 2A^{pro} was synthesized at the same time as Luc mRNA was engaged in translation. Moreover, using this Luc mRNA transfection method, we could analyze the Luc activity derived from the translation of this mRNA over time. Interestingly, this mRNA transfection method proved very reliable given that a similar amount of Luc mRNA was detected in *cap-Luc* transfected cells at 2 hpe regardless of the EMC-2A dose used (Fig. 4B). Luc activity and the integrity of initiation factors were analyzed at 4, 6, and 8 hpe. Total hydrolysis of eIF4GI with partial cleavage of eIF4GII was induced by electroporation of HeLa cells with 1 μg of EMC-2A, whereas total proteolysis of both isoforms of eIF4G was achieved in cells electroporated with 9 μg of this mRNA. Cleavage of PABP did not occur in either case (data not shown).

Luc activity increased up to 6 hpe in cells electroporated with *cap-Luc* in the absence of EMC-2A mRNA. Partial inhibition of Luc activity was detected in cells co-electroporated with 1 μg of EMC-2A, whereas in cells co-electroporated with a higher

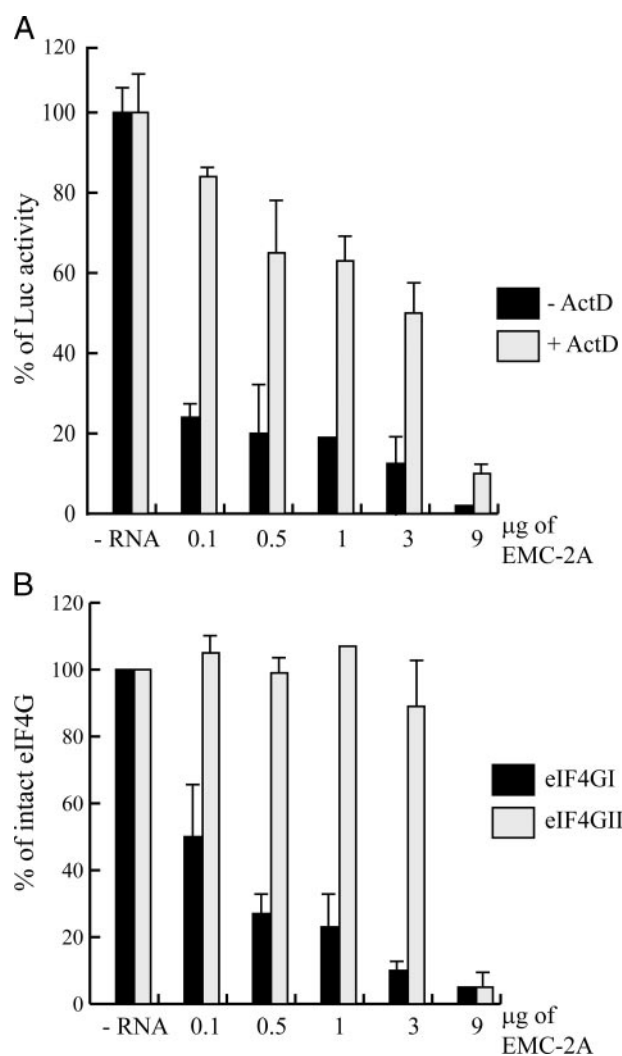


FIGURE 3. Effect of eIF4GI hydrolysis on translation of preexisting Luc mRNA. X1/5 HeLa cells were washed twice with phosphate-buffered saline, and then culture medium was added. 4 h after Luc induction cells were electroporated with 0.1, 0.5, 1, 3, and 9 μg of EMC-2A. Before electroporation cells were treated with 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ActD or left untreated. Luciferase activity and integrity of initiation factor were analyzed at 0 and 4 hpe. *A*, relative representation of luciferase activity from ActD treated or untreated cells at 4 hpe compared with control cells. *B*, comparative representation of the level of intact eIF4GI and eIF4GII.

amount of this mRNA (9 μg), Luc activity was strongly inhibited (Fig. 4C). Expression of cap-Luc-poly(A) was 6-fold higher than that obtained with cap-Luc and 30-fold higher than with Luc-Poly(A) at 6 hpe (Fig. 4, C and D, and supplemental Fig. 11). In the case of cap-Luc-poly(A), Luc activity increased with time, indicating longer-lasting stability than cap-Luc. Cap-Luc-poly(A) mRNA translation was partially affected (about 30–60% inhibition) in cells co-electroporated with 1 μg of EMC-2A. Transfection of 9 μg of this mRNA completely repressed Luc activity (Fig. 4D). As expected, uncapped Luc mRNA was not translated in HeLa cells (supplemental Fig. 11). The extent of translation of uncapped and polyadenylated Luc mRNA observed in control cells was small. The expression of 2A^{Pro} from EMC-2A mRNA provoked partial inhibition of Luc activity in a dose-independent manner (supplemental Fig. 11). These findings lend support to the idea that cleavage of eIF4GI partially affects translation of mRNAs present in polysomes and

are in agreement with the data on actin synthesis presented in Fig. 2. In contrast, cleavage of both isoforms of eIF4G strongly blocked the translation of these mRNAs (Fig. 4, C and D). Moreover, proteolysis of eIF4GI and eIF4GII in cells containing intact PABP is sufficient to abrogate translation of capped and polyadenylated mRNAs (Fig. 4D).

Translation of an IRES-containing mRNA under Conditions of eIF4G Cleavage—The mRNAs of picornavirus are uncapped and polyadenylated. The 5'-untranslated region of these mRNAs allows recruitment of the 40 S ribosomal subunit under conditions in which the eIF4F complex is disrupted by viral protein activity (2). Translation of picornavirus IRES-containing mRNAs is enhanced by the presence of a poly(A) tail at its 3' end (27, 28). EMCV IRES has been classified as type II on the basis of its primary sequence and secondary structure conservation and its requirements for optimal internal initiation *in vitro* (29). We, therefore, used the IRES of EMCV to investigate the effect of differential cleavage of eIF4GI and eIF4GII in IRES-driven translation in transfected cells.

Thus, two mRNAs were obtained by *in vitro* transcription from the pTM1-Luc plasmid. One mRNA contained the 5'-untranslated region of EMCV followed by the Luc gene (*EMC-Luc*), whereas in the other mRNA, the poly(A) tail was added by *in vitro* polyadenylation (*EMC-Luc-poly(A)*) (Fig. 5A). HeLa cells were co-electroporated with 9 μg of each EMCV IRES-containing mRNA together with 1 or 9 μg of EMC-2A or transcription buffer as a control. The Luc activity and the integrity of initiation factors were analyzed at 4, 6, and 8 hpe. The PV 2A^{Pro} expression system described above is highly reproducible. Thus, 1 μg of EMC-2A mRNA brought about significant cleavage of eIF4GI, whereas eIF4GII remained largely intact. However, electroporation of 9 μg of this mRNA led to total cleavage of both eIF4G isoforms (data not shown). Most of the Luc synthesized from EMC-Luc was produced before 4 hpe. After this point only a slight increase in Luc activity was achieved (Fig. 5B). The same effect was found with this mRNA when it was co-transfected with a low dose of EMC-2A. However, powerful stimulation of the Luc activity was observed when a high dose of EMC-2A was employed (Fig. 5B). Translation of this mRNA was enhanced at all times compared with control cells. These data suggest that significant hydrolysis of eIF4GI and eIF4GII is required to induce total transactivation of EMCV IRES-driven translation in culture cells. To our knowledge these findings provide the first evidence in culture cells that extensive cleavage of both isoforms of eIF4G is necessary for full stimulation of EMCV IRES-driven translation. Synthesis of Luc from EMC-Luc-poly(A) was significantly stimulated compared with its counterpart lacking the poly(A) tail (~7-fold at 8 hpe) (Fig. 5B). Only slight enhancement was observed when this mRNA was co-expressed with 2A^{Pro} regardless of the EMC-2A dose employed (Fig. 5B). Therefore, EMC-Luc is more extensively transactivated by 2A^{Pro} activity than EMC-Luc-poly(A). Notably, the differences in the Luc activity obtained from EMC-Luc and EMC-Luc-poly(A) disappeared when a high dose of EMC-2A was used (Fig. 5B).

Synthesis of Heat Shock Proteins; Effect of the Differential Cleavage of eIF4GI and eIF4GII—Several host mRNAs can be translated by a cap-independent mechanism. This is the case

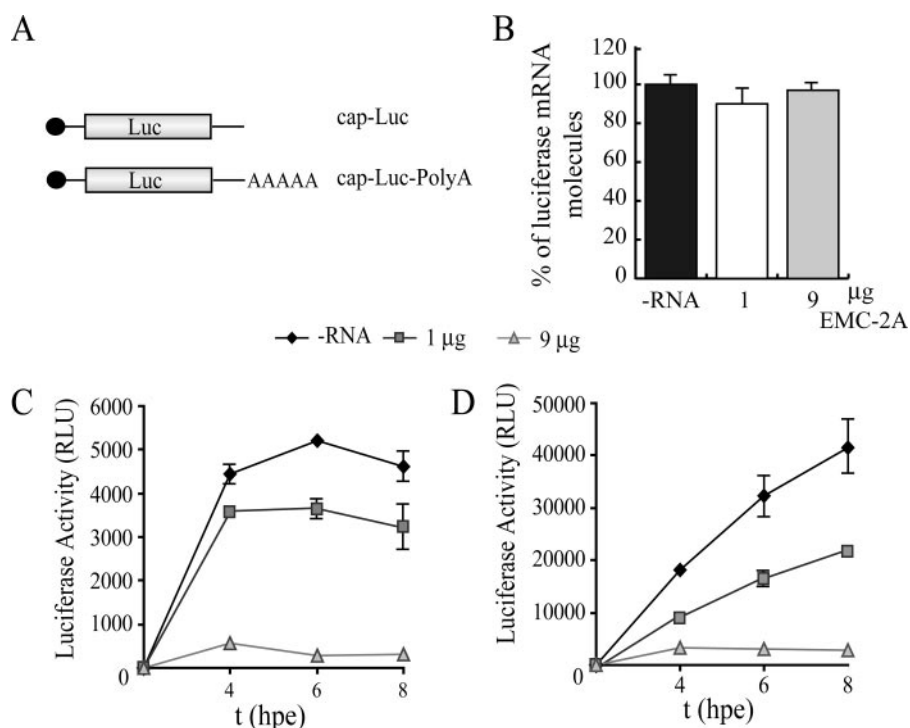


FIGURE 4. Effect of eIF4GI and eIF4GII cleavage by PV 2A^{Pro} in the translation of different Luc mRNAs. *A*, schematic representation of the different transfected Luc mRNAs. HeLa cells were co-electroporated with 9 μg of a Luc mRNA and with 1 or 9 μg of EMC-2A or transcription buffer. Luc activity was measured at 4, 6, and 8 hpe. *B*, total RNA was isolated at 2 hpe from cells co-electroporated with cap-Luc mRNA and the different doses of EMC-2A. The amount of Luc mRNA was quantified as described under "Materials and Methods." The relative level of RNA was represented with respect to control cells. *C*, Luc activity obtained at the times indicated from cells co-transfected with different doses of EMC-2A and cap-Luc mRNA. *D*, cap-Luc-poly(A) mRNA. *RLU*, relative light units.

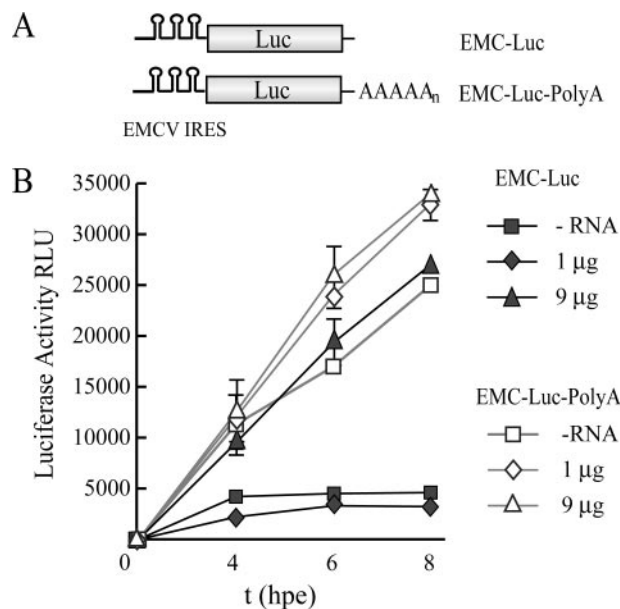


FIGURE 5. IRES-driven translation upon differential cleavage of eIF4GI and eIF4GII. HeLa cells were co-electroporated with 9 μg of EMC-Luc or EMC-Luc-poly(A) together with 1 or 9 μg of EMC-2A or transcription buffer. The Luc activity in each case was measured at 4, 6, and 8 hpe. *A*, schematic representation of the IRES-containing mRNAs. *B*, Luc activity obtained from EMC-Luc or EMC-Luc-poly(A) in co-transfected cells. *RLU*, relative light units.

for Hsp70 mRNA (17), which may contain an IRES element at its 5'-untranslated region (30). Alternatively, it may be translated by a "shunting mechanism" under heat shock conditions

(31). We, therefore, considered it of interest to assay the action of the differential cleavage of both eIF4G isoforms in the initiation of translation of Hsp70 mRNA. HeLa cells were electroporated with 1, 2, 4, or 9 μg of EMC-2A mRNA. As controls, cells were transfected with 9 μg of EMC-2C mRNA or with transcription buffer. At 5 hpe cells were incubated at 42 $^{\circ}\text{C}$ for 3 h to trigger the heat shock response. Host protein synthesis and the integrity of the different initiation factors were analyzed at 4 and 8 hpe (3 h post-heat shock). As shown in Fig. 2, the repression of host protein synthesis and proteolysis of both eIF4G isoforms took place in a dose- and time-dependent manner (Fig. 6, *A* and *B*). Once again, significant hydrolysis of eIF4GI without eIF4GII cleavage had only a slight effect on cellular protein synthesis. Notably, a strong shutoff of host translation was observed that correlated with eIF4GII hydrolysis (Fig. 6, *A* and *B*). At 3 h post-heat shock, Hsp70 synthesis was detected (Fig. 6*A*). Under conditions in which eIF4GI was

totally cleaved and eIF4GII remained largely intact, *de novo* synthesized Hsp70 mRNA can be translated at a level similar to that observed in control cells (Fig. 6, *A* and *B*, *seventh* lane). However, a decrease in Hsp70 synthesis was detected coinciding with an increase in the dose of EMC-2A (Fig. 6, *A* and *C*). When eIF4GI and eIF4GII were significantly cleaved by PV 2A^{Pro}, Hsp70 synthesis was about 35–25%, whereas endogenous mRNAs were strongly inhibited (about 10% of actin synthesis) (Fig. 6, *A* and *B*, *eleventh* lane). The amount of Hsp70 mRNA was analyzed by RT-PCR. At 3 h post-heat shock, the amount of this mRNA decreased in a dose-dependent manner in transfected cells (supplemental Fig. 12). A decrease in the amount of Hsp70 mRNA had been observed previously when hybrid proteins that contain PV 2A^{Pro} were introduced in HeLa cells (17). Nevertheless, the electroporation of 9 μg of EMC-2A induced a 30–40% decrease in the amount of Hsp70 mRNA, whereas the synthesis of the heat shock protein was greatly inhibited (65–75%). Therefore, blockade of the initiation of Hsp70 mRNA translation was not entirely due to decreased mRNA concentrations. These findings reveal that the first initiation event in some host mRNAs might be more susceptible to eIF4GII proteolysis than to eIF4GI degradation. These results taken together with the findings reported earlier suggest that eIF4GI and eIF4GII may have differential roles in the translation of different cellular mRNAs.

Two PV 2A^{Pro} variants, D135N (M6) and V119M (M7), that failed to repress host transcription but maintained their capacity to proteolyze eIF4GI, have been described (21). Because

Differential Cleavage of eIF4GI and eIF4GII

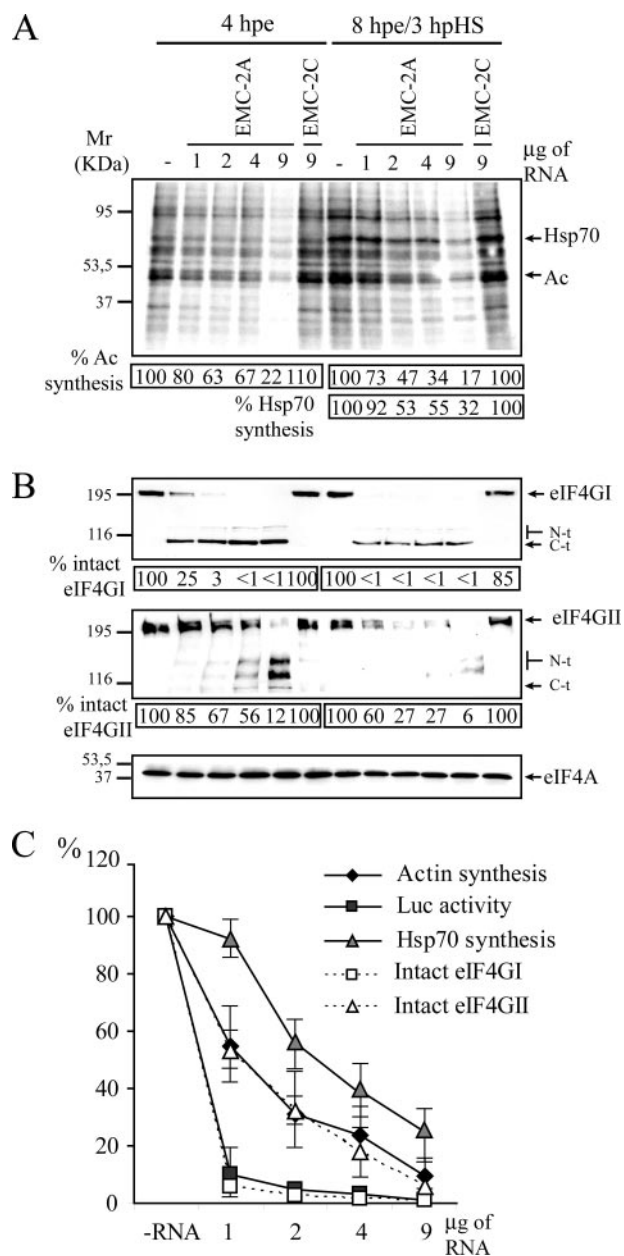


FIGURE 6. Translation of Hsp70 mRNA in HeLa cells containing the two isoforms of eIF4G differentially cleaved. HeLa cells were electroporated with 1, 2, 4, or 9 μg of EMC-2A, 9 μg of EMC-2C, or transcription buffer. At 5 hpe, cells were incubated at 42 °C for 3 h. Proteins were labeled from 3 to 4 or from 7 to 8 hpe. **A**, analysis of protein synthesis by SDS-PAGE, fluorography, and autoradiography. *Ac*, actin. *N-t*, N-terminal fragments of eIF4GI or eIF4GII; *C-t*, C-terminal fragments of eIF4GI or eIF4GII. **B**, Western blotting against eIF4GI (upper panel), eIF4GII (middle panel), and eIF4A (lower panel). *N-t*, N-terminal fragments of eIF4GI or eIF4GII; *C-t*, C-terminal fragments of eIF4GI or eIF4GII. **C**, comparative representation of the level of intact eIF4GI and eIF4GII with the translation of *de novo* synthesized Luc or Hsp70 mRNAs and actin synthesis. These data were obtained from five independent experiments including the results shown in Figs. 2, *A*, *B*, and *D*, and 5, *A* and *B*. *hpHS*, hours post-heat shock.

Hsp70 mRNA transcription was partially inhibited by 2A^{pro} expression, mRNAs that encode these two 2A^{pro} mutants were transfected to analyze their effect on Hsp70 synthesis. Transfection of high doses of these mRNAs largely hydrolyzes both eIF4G isoforms leading to blockade of actin as well as Hsp70 synthesis. Analysis of the Hsp70 mRNA by real-time RT-PCR

revealed that 2A^{pro} M6 and M7 failed to repress host transcription (supplemental Fig. 13). Thus, the inhibition of Hsp70 synthesis in 2A^{pro} M6- and M7-expressing cells is not only due to the blockade of transcription but also to their direct effect on translation.

Ongoing mRNA Translation and Hsp70 Synthesis in BHK Cells Transfected with EMC-2A—To analyze the differential cleavage of the two isoforms of eIF4G by 2A^{pro} in another cell line, BHK cells were electroporated with 1, 2, 4, 6, 9, or 18 μg of EMC-2A. At 5 hpe, cells were incubated at 42 °C for 3 h to trigger the heat shock response. Host protein synthesis and integrity of translation initiation factors were analyzed at 8 hpe in cells incubated at 37 °C and in cells subjected to heat shock for 3 h (8 hpe and 3 h post-heat shock). In both cases a gradual dose-dependent inhibition of protein synthesis was achieved (Fig. 6*A*). eIF4GI and eIF4GII were also proteolyzed in a dose-dependent manner, whereas PABP remained intact in each case (Fig. 7, *B* and *C*). Previous analyses of eIF4GI using specific antibodies have revealed the existence of two proteins of ~220 and ~150 kDa, respectively, in BHK cells (22). As described earlier, eIF4G exhibits different mobility patterns in SDS-PAGE of mammalian cells, possibly due to post-translational modifications (32). Alternatively, one of the proteins could be a breakdown product of eIF4G. Both 220- and 150-kDa polypeptides disappeared in 2A^{pro}-expressing cells. Only the C-terminal proteolytic fragment could be detected with anti-eIF4GI antibodies (22). Surprisingly, proteolysis kinetics of eIF4GI was delayed with respect to eIF4GII in BHK cells (Fig. 7*B*). eIF4GII was extensively proteolyzed at 8 hpe using 18 μg of EMC-2A, whereas under these conditions 40–50% of the eIF4GI remained intact (Fig. 7*B*). Notably, the inhibition of ongoing protein synthesis correlated well with the proteolysis of eIF4GII (Fig. 7, *A*, *B*, and *D*). Under conditions where 75–85% of eIF4GII was cleaved by 2A^{pro} and about 100–60% of eIF4GI remained intact, host translation dropped to nearly 35% (Fig. 7, *A* and *B*, *sixth* and *thirteenth* lanes). These results provide further evidence for the essential role that eIF4GII plays in the translation of mRNAs already engaged in translation.

Translation of Hsp70 mRNA was also analyzed in BHK cells. The heat shock treatment was carried out at 5 hpe. Thus, Hsp70 mRNA synthesis started when eIF4GI and eIF4GII were already hydrolyzed (data not shown). Synthesis of Hsp70 was detected at 3 h post-heat shock treatment. Hsp70 synthesis was also inhibited in a dose-dependent manner (Fig. 7*A*). Interestingly, significant inhibition of the initiation of translation of Hsp70 mRNA (about 60–65%) was observed when 6 μg of EMC-2A was used. In these cells eIF4GII was fully cleaved, although all eIF4GI remained intact (Fig. 7, *A* and *B*, *twelfth* lane). These results were reproduced by Western blotting with an antibody against Hsp70 (data not shown). Notably, inhibition of Hsp70 and actin synthesis correlated well with the proteolysis of eIF4GII in this cell line (Fig. 7*D*).

Cytoplasmic Initiation of Translation in EMC-2A-transfected HeLa and BHK Cells—To determine the involvement of eIF4GI and eIF4GII in the first translation event of preexisting mRNAs, polysome run-off was induced both in HeLa and BHK cells (Fig. 8). Cells were incubated with hypertonic medium to inhibit of the initiation of translation, although elongation

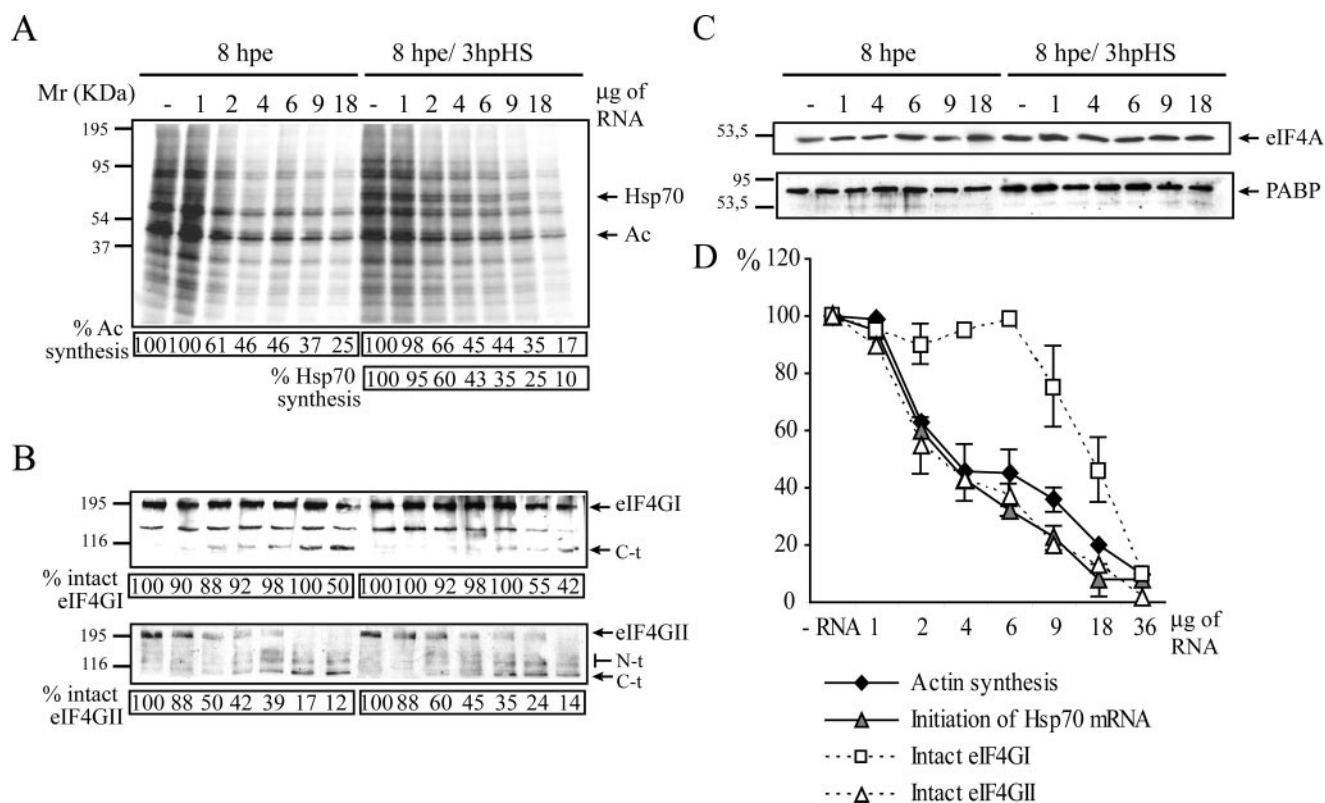


FIGURE 7. **Effect of PV 2A^{Pro} in BHK-21 cells.** BHK cells were electroporated with 1, 2, 4, 6, 9, or 18 μ g of EMC-2A or with transcription buffer alone. Half of the cells were subjected to heat shock treatment (42 °C) at 5 hpe for 3 h. The remaining cells were incubated at 37 °C throughout the time course. In both cases the proteins were labeled at 7 hpe for 1 h. *A*, analysis of protein synthesis by SDS-PAGE followed by fluorography and autoradiography. *hpHS*, hours post-heat shock. *B*, Western blotting against eIF4GI (upper panel) and eIF4GII (lower panel). *C*, Western blotting against eIF4A (upper panel) and PABP (lower panel). *D*, comparative representation of the level of intact eIF4GI and eIF4GII and translation of *de novo* synthesized Hsp70 mRNAs and preexisting actin mRNA in cells transfected with different amounts of EMC-2A. These data were obtained from three independent experiments and are represented as percentage with respect to control cells.

still takes place. This treatment provokes polysome run-off, whereas a return to normal medium leads to initiation of translation on ribosome-stripped mRNA (22, 17). HeLa or BHK cells were electroporated with the EMC-2A at the doses indicated (Fig. 8). At 8 hpe the culture medium was supplemented with 150 mM NaCl for 2 h, giving rise to polysome run-off. At 10 hpe, normal ionic conditions were restored to determine the first translation initiation event on preexisting cytoplasmic mRNAs. Protein synthesis, eIF4GI and eIF4GII integrity (Fig. 8), and the amount of eIF4A (data not shown) were determined at 8, 10, and 12 hpe.

Potent proteolysis of eIF4GI was achieved in HeLa cells transfected with 1 and 3 μ g of EMC-2A. Under these conditions the level of protein synthesis was similar to control cells (Fig. 8A). It is noteworthy that a high dose of EMC-2A induced strong inhibition of ongoing translation concomitantly with eIF4GI and eIF4GII hydrolysis. When cells were incubated with hypertonic medium, translation was abrogated, indicating that polysome run-off took place (Fig. 8A). Notably, protein synthesis was recovered in control cells and cells electroporated with low doses of EMC-2A after restoring normal conditions, even though eIF4GI was cleaved in the latter case. Only cells transfected with high doses of EMC-2A did not recover translation (Fig. 8A). These data suggest that integrity of eIF4GI is not essential for cytoplasmic initiation of translation to occur.

The inhibition of endogenous translation in BHK-cells correlated with eIF4GII inactivation at 8 hpe (Fig. 8B). Treatment of BHK cells with hypertonic medium blocked translation in all cases irrespective of eIF4GII integrity. When normal conditions were restored, preexisting mRNAs were engaged in translation both in control cells and BHK cells transfected with a low dose of EMC-2A in which eIF4G remained intact. However, a significant inhibition of initiation of translation was observed in cells electroporated with 9 or 18 μ g of EMC-2A. In cells transfected with 9 μ g of mRNA, eIF4GII was hydrolyzed, with about 90% of the eIF4GI remaining intact. These results indicate that eIF4GII is essential for the first events of initiation on cytoplasmic mRNAs.

DISCUSSION

A wide variety of animal viruses such as several picornaviruses, retroviruses, and caliciviruses bring about the cleavage of initiation factors in infected cells to modulate host and viral translation. In this respect, eIF4GI, eIF4GII, and PABP are some of the most common cellular targets for viral proteases (2, 9). Nevertheless, the particular contribution of hydrolysis of each of these initiation factors to the inhibition of host protein synthesis is not yet well established. The method of PV 2A^{Pro} expression described here differentially cleaves eIF4GI and eIF4GII, leaving PABP intact. Such a system can help elucidate

Differential Cleavage of eIF4GI and eIF4GII

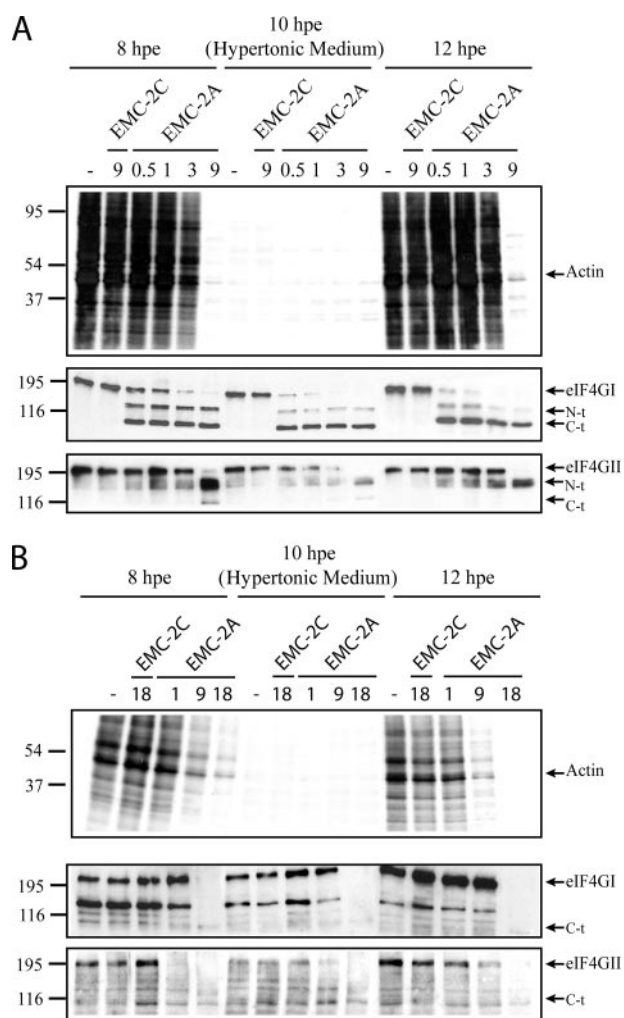


FIGURE 8. Effect of eIF4GI and eIF4GII cleavage on the initiation of translation after exposure to hypertonic medium. HeLa and BHK cells were electroporated with 0.5, 1, 3, and 9 or 1, 9, and 18 μ g of EMC-2A, respectively. In both cases transcription buffer and high dose of EMC-2C were used as controls. At 8 hpe, 150 mM NaCl was added, giving rise to a final concentration of 300 mM in the culture medium. These conditions were maintained for 2 h. At 10 hpe, hypertonic medium was removed, and the cells were washed twice with phosphate-buffered saline. Normal medium was then restored. Protein synthesis and the integrity of initiation factors were analyzed at 8, 10, and 12 hpe. *A*, hypertonic treatment in HeLa cells. Shown is an analysis of protein synthesis by SDS-PAGE followed by fluorography and autoradiography (upper panel) as well as Western blotting against eIF4GI (middle panel) and eIF4GII (lower panel). *N-t*, N-terminal fragments of eIF4GI or eIF4GII; *C-t*, C-terminal fragments of eIF4GI or eIF4GII. *B*, hypertonic treatment in BHK cells. Shown is an analysis of protein synthesis by SDS-PAGE followed by fluorography and autoradiography (upper panel) as well as Western blotting against eIF4GI (middle panel) and eIF4GII (lower panel).

the exact role played by cleavage of these two isoforms of eIF4G during the initiation of translation. This assay is easy to perform and reproducible and led to efficient cleavage of eIF4G very soon after transfection of the majority of culture cells. Moreover, the proportion of the two eIF4G isoforms cleaved varied according to dose of EMC-2A mRNA transfected. Interestingly, the kinetics of eIF4GI cleavage in BHK cells is delayed compared with HeLa cells. Thus, hydrolysis of eIF4GI occurs after eIF4GII cleavage. This method is much more efficient, rapid, and reliable than other methods previously described, such as HeLa cell lines that can be induced to express PV 2A^{Pro}, direct penetration of hybrid proteins that contain this protease, or

coupled infection with recombinant vaccinia virus T7 and transfection with pTM1-2A (20, 17, 21).

The different kinetics of cleavage of the two isoforms of eIF4G observed in HeLa and BHK cells can be accounted for by the differences in the primary structure of the corresponding initiation factors. Comparison of the amino acid sequence of human and mouse eIF4GI (since the sequence of hamster eIF4G is not available) reveals several changes in the amino acid residues around the cleavage site of 2A^{Pro} (Thr by Ser at P2, Thr by Ala at P5, and Thr by Pro at P6) (Berger and Schechter notation) (44). Variations at the P2 position of the cleavage site recognized by 2A^{Pro} are very restrictive for *trans* substrate proteolysis (33). On the other hand, the proteolysis site of human eIF4GII recognized by 2A^{Pro} has not yet been identified. In this regard, the rhinovirus 2A^{Pro} cleavage site (another Enterovirus) is well conserved in mouse eIF4GII (34). These data may account for the different kinetics of eIF4GI hydrolysis observed in the two cell lines and the similar susceptibility of eIF4GII to PV 2A^{Pro} expression.

Translation of Luc mRNA on induction of the HeLa cell line X1/5 is strongly inhibited by transfection of EMC-2A mRNA. This blockade correlated well with eIF4GI inactivation despite the fact that eIF4GII remained largely intact. The Luc mRNA synthesized in HeLa X1/5 cells is capped and polyadenylated by the host enzymes and contains a leader sequence typical of most cellular mRNAs (17). These data reveal that eIF4GI could participate in the recognition of newly synthesized cellular mRNAs. eIF4GI not only interacts with the cytoplasmic translation initiation complex (known as the steady-state complex) but it is also present in the pioneer translation initiation complex in the nucleus, bound to the nuclear cap binding proteins CBP80 and CBP20, and it is associated with pre-mRNAs (Fig. 9) (35–38). Hydrolysis of eIF4GI by HIV-2 PR or 2A^{Pro} blocks steady-state translation as well as the pioneer round of protein synthesis on virgin mRNAs (37). Nevertheless, HIV-2 PR also cleaves PABP, whereas eIF4GII is substrate for 2A^{Pro} (24, 14). Thus, in the present work we found that single hydrolysis of eIF4GI did not inhibit the first initiation event after polysome run-off. These data suggest that hydrolysis of eIF4GI could inhibit the pioneer translation initiation complex for translation of mRNAs transported from the nucleus, whereas this isoform is not essential for the steady-state complex (Fig. 9).

Previous findings indicated that translation of mRNAs already engaged in the protein-synthesis machinery is resistant to eIF4GI cleavage (11–13, 39). Earlier reports showed a good correlation between eIF4GII hydrolysis and the shutoff of host protein synthesis (14–16). As shown in this work, individual expression of PV 2A^{Pro} hydrolyzes eIF4GII with delayed kinetics as compared with eIF4GI in HeLa cells. In this cell line, the decrease in ongoing protein synthesis coincides with eIF4GII cleavage. Moreover, translation of a capped and polyadenylated Luc mRNA previously associated with polysomes was fully blocked when both initiation factor isoforms were proteolyzed, whereas the effect was partial when only eIF4GI was cleaved in Luc mRNA transfected as well as ActD-treated HeLa cells. These observations are further reinforced in BHK cells, where eIF4GII was hydrolyzed by 2A^{Pro} more rapidly than eIF4GI. Therefore, in both HeLa and BHK cells, the inhibition of trans-

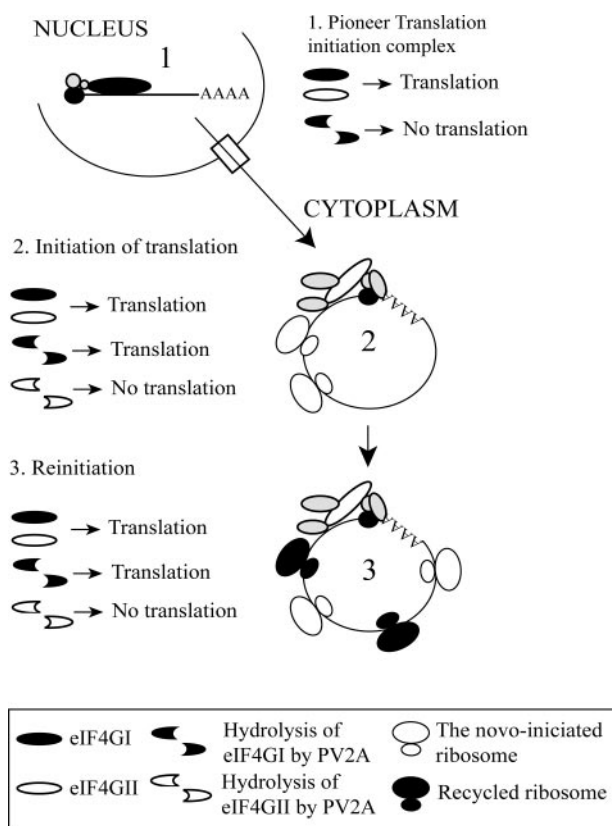


FIGURE 9. Schematic representation of the differential mechanism of action of both isoforms of eIF4G in the translation of Luc mRNA in HeLa X1/5 cells. eIF4GI may be essential for the translation of an mRNA synthesized in the nucleus. This factor could transport and present the mRNA to the protein synthesizing machinery, whereas eIF4GII is necessary to initiate translation of cytoplasmic mRNAs. eIF4GII could be indispensable for the translation reinitiation process.

lation of preexisting mRNAs correlates well with the inactivation of eIF4GII. In this respect, a recent report suggests that both forms of eIF4G can be differentially recruited to the mRNA cap structure at the same time as the onset of cell differentiation (40). Therefore, eIF4GII integrity could be essential for ongoing translation given the fact that when eIF4GII was hydrolyzed and a large proportion of eIF4GI remained intact, translation of endogenous mRNAs was blocked by about 60–80% in BHK cells. Besides, cleavage of eIF4GI by $2A^{P\text{ro}}$ in HeLa cells, although maintaining eIF4GII intact, only decreased endogenous translation by about 5–30%. These findings do not support the possibility that variations in the amount of total eIF4G affect ongoing translation since eIF4GII is a minority component compared with eIF4GI (10–15%) (2, 10, 25).

PV, Coxsackievirus, and Calicivirus infection induce cleavage of PABP (10). It has been suggested that PABP may play an important role in the PV induced shutoff of protein synthesis (18). Nevertheless, significant cleavage of PABP is only detected at 4–5 hpe, whereas block of cellular protein synthesis by PV occurs earlier, at the same time as hydrolysis of eIF4G. The possibility that $3C^{P\text{ro}}$ may exhibit a high affinity for ribosome-associated PABP has been put forward to support this hypothesis (10). Notably, the addition of a recombinant PABP with the four RRM motifs but lacking the CTD domain in a PABP-de-

pleted Krebs-2 extract partially restored translation (41). This truncated protein is similar to the N-terminal product obtained from proteolysis of PABP by $2A^{P\text{ro}}$ or $3C^{P\text{ro}}$ (10), although the C-terminal product of PABP was not present. In the system described here $2A^{P\text{ro}}$ strongly inhibited ongoing host translation without affecting PABP integrity. Moreover, under these conditions there was a strong inhibition of translation of a capped and polyadenylated Luc mRNA. In this regard the interaction between eIF4G and PABP has been described as a requirement for the efficient assembly of translation machinery and for the poly(A) tail-dependent stimulation of translation (41). Because proteolysis of eIF4G by $2A^{P\text{ro}}$ separates the PABP interaction domain, the absence of eIF4E and PABP binding sites in this initiation factor may abrogate the translation of a capped and polyadenylated mRNA. Therefore, the hydrolysis of either eIF4G or PABP could in principle contribute independently to the shutoff of host protein synthesis.

PV $2A^{P\text{ro}}$ has two opposite effects on gene expression. On the one hand, this protease abrogates host protein synthesis, but it can also stimulate PV translation (20, 2, 9). The findings described in the present work certainly support these opposing effects, since there is a correlation between eIF4G hydrolysis and the inhibition of cellular protein synthesis, whereas translation driven by EMCV IRES element is stimulated (high EMC-2A dose) or at least is not affected (low EMC-2A dose) under these conditions.

As observed, a mRNA containing EMCV IRES and poly(A) tail is more competitive for the translational machinery than a mRNA containing just EMCV IRES. Cleavage of eIF4G by PV $2A^{P\text{ro}}$ separates its PABP binding domain, abolishing the stimulation provided by poly(A) tail (41, 27). This behavior was also observed for polyadenylated picornavirus IRES-containing mRNAs (27, 28). When eIF4G is hydrolyzed, the EMC-Luc and EMC-Luc-Poly(A) mRNAs exhibit a similar translatability since poly(A) tail does not contribute to mRNA translation. Therefore, translation of EMC-Luc-poly(A) mRNA is enhanced in control cells by EMCV IRES and poly(A) tail cooperation. However, when eIF4GI and eIF4GII are hydrolyzed by PV $2A^{P\text{ro}}$, EMC-Luc is strongly benefited from the reduction in competition of host mRNAs for the translation machinery equalizing its translatability to EMC-Luc-Poly(A). In this regard, Paip-2 and rotavirus NSP3, two inhibitors of poly(A) tail-dependent stimulation (42, 43), strongly blocked the translation of polyadenylated EMCV IRES-containing mRNA *in vitro*, whereas translation was not affected in the presence of rhinovirus $2A^{P\text{ro}}$ (27, 28). These data suggest that poly(A) tail does not contribute to translation initiation when eIF4G is proteolyzed.

Another mRNA classified as IRES-containing is Hsp70 mRNA (30). The dependence of translation of this mRNA on some initiation factors is low, and translation was significant when eIF4GI was cleaved by $2A^{P\text{ro}}$ (17). In good agreement with these data, our present findings suggest that the initiation of translation of *de novo* synthesized Hsp70 mRNA is not dependent on eIF4GI integrity. However, an increase in the dose of EMC-2A induced a partial reduction in the Hsp70 mRNA level, although this decrease did not fully account for inhibition of the Hsp70 synthesis. Strikingly, a gradual block of the translation of

Differential Cleavage of eIF4GI and eIF4GII

Hsp70 mRNA occurs at the same time as eIF4GII cleavage. Moreover, high doses of EMC-2AM6 and EMC-2AM7 also induced the cleavage of the two isoforms of eIF4G and strongly inhibited Hsp70 and actin synthesis, although host transcription was only slightly affected. These findings could support the view that eIF4GI and eIF4GII have a differential participation in the initiation of translation of different cellular mRNAs.

Therefore, the effect of eIF4GI and/or eIF4GII hydrolysis on translation varies according to the mRNA analyzed. The use of different viral proteases that cleave the two isoforms of eIF4G and PABP in a differential manner may help to elucidate the exact role that each of these factors plays in the translation of cellular and viral mRNAs.

REFERENCES

1. Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999) *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 913–963
2. Prevot, D., Darlix, J. L., and Ohlmann, T. (2003) *Biol. Cell* **95**, 141–156
3. Imataka, H., Gradi, A., and Sonenberg, N. (1998) *EMBO J.* **17**, 7480–7489
4. Mader, S., Lee, H., Pause, A., and Sonenberg, N. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4990–4997
5. Korneeva, N. L., Lamphear, B. J., Hennigan, F. L., and Rhoads, R. E. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 41369–41376
6. Gingras, A. C., Gygi, S. P., Raught, B., Polakiewicz, R. D., Abraham, R. T., Hoekstra, M. F., Aebersold, R., and Sonenberg, N. (1999) *Genes Dev.* **13**, 1422–1437
7. Pyronnet, S., Imataka, H., Gingras, A. C., Fukunaga, R., Hunter, T., and Sonenberg, N. (1999) *EMBO J.* **18**, 270–279
8. Korneeva, N. L., Lamphear, B. J., Hennigan, F. L., Merrick, W. C., and Rhoads, R. E. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 2872–2879
9. Schneider, R. J., and Mohr, I. (2003) *Trends Biochem. Sci.* **28**, 130–136
10. Kuyumcu-Martinez, N. M., Joachims, M., and Lloyd, R. E. (2002) *J. Virol.* **76**, 2062–2074
11. Bonneau, A. M., and Sonenberg, N. (1987) *J. Virol.* **61**, 986–991
12. Irurzun, A., Sanchez-Palomino, S., Novoa, I., and Carrasco, L. (1995) *J. Virol.* **69**, 7453–7460
13. Keiper, B. D., and Rhoads, R. E. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 395–402
14. Gradi, A., Svitkin, Y. V., Imataka, H., and Sonenberg, N. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 11089–11094
15. Marissen, W. E., Gradi, A., Sonenberg, N., and Lloyd, R. E. (2000) *Cell Death Differ.* **7**, 1234–1243
16. Svitkin, Y. V., Gradi, A., Imataka, H., Morino, S., and Sonenberg, N. (1999) *J. Virol.* **73**, 3467–3472
17. Novoa, I., and Carrasco, L. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2445–2454
18. Kuyumcu-Martinez, N. M., Van Eden, M. E., Younan, P., and Lloyd, R. E. (2004) *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1779–1790
19. Gossen, M., and Bujard, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 5547–5551
20. Barco, A., Feduchi, E., and Carrasco, L. (2000) *J. Virol.* **74**, 2383–2392
21. Ventoso, I., Barco, A., and Carrasco, L. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 27960–27967
22. Castello, A., Sanz, M. A., Molina, S., and Carrasco, L. (2006) *J. Mol. Biol.* **355**, 942–956
23. Alvarez, E., Menendez-Arias, L., and Carrasco, L. (2003) *J. Virol.* **77**, 12392–12400
24. Alvarez, E., Castello, A., Menendez-Arias, L., and Carrasco, L. (2006) *Biochem. J.* **396**, 219–226
25. Joachims, M., Van Breugel, P. C., and Lloyd, R. E. (1999) *J. Virol.* **73**, 718–727
26. Maeda, Y., Nunomura, K., and Ohtsubo, E. (1990) *J. Mol. Biol.* **215**, 321–329
27. Michel, Y. M., Borman, A. M., Paulous, S., and Kean, K. M. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21**, 4097–4109
28. Svitkin, Y. V., Imataka, H., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., Liebig, H. D., and Sonenberg, N. (2001) *RNA* **7**, 1743–1752
29. Borman, A. M., Bailly, J. L., Girard, M., and Kean, K. M. (1995) *Nucleic Acids Res.* **23**, 3656–3663
30. Rubtsova, M. P., Sizova, D. V., Dmitriev, S. E., Ivanov, D. S., Prassolov, V. S., and Shatsky, I. N. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 22350–22356
31. Yueh, A., and Schneider, R. J. (2000) *Genes Dev.* **14**, 414–421
32. Lamphear, B. J., Kirchwegger, R., Skern, T., and Rhoads, R. E. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 21975–21983
33. Hellen, C. U., Lee, C. K., and Wimmer, E. (1992) *J. Virol.* **66**, 3330–3338
34. Gradi, A., Foeger, N., Strong, R., Svitkin, Y. V., Sonenberg, N., Skern, T., and Belsham, G. J. (2004) *J. Virol.* **78**, 3271–3278
35. Chiu, S. Y., Lejeune, F., Ranganathan, A. C., and Maquat, L. E. (2004) *Genes Dev.* **18**, 745–754
36. Fortes, P., Inada, T., Preiss, T., Hentze, M. W., Mattaj, I. W., and Sachs, A. B. (2000) *Mol. Cell* **6**, 191–196
37. Lejeune, F., Ranganathan, A. C., and Maquat, L. E. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 992–1000
38. McKendrick, L., Thompson, E., Ferreira, J., Morley, S. J., and Lewis, J. D. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3632–3641
39. Perez, L., and Carrasco, L. (1992) *Virology* **189**, 178–186
40. Caron, S., Charon, M., Cramer, E., Sonenberg, N., and Dusanter-Fourt, I. (2004) *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4920–4928
41. Kahvejian, A., Svitkin, Y. V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M. N., and Sonenberg, N. (2005) *Genes Dev.* **19**, 104–113
42. Khaleghpour, K., Svitkin, Y. V., Craig, A. W., DeMaria, C. T., Deo, R. C., Burley, S. K., and Sonenberg, N. (2001) *Mol. Cell* **7**, 205–216
43. Piron, M., Vende, P., Cohen, J., and Poncet, D. (1998) *EMBO J.* **17**, 5811–5821
44. Berger, A., and Schechter, I. (1970) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **257**, 249–264

Differential inhibition of cellular and Sindbis virus translation by brefeldin A

Susana Molina*, Miguel A. Sanz, Vanesa Madan, Iván Ventoso, Alfredo Castelló, Luis Carrasco

Centro de Biología Molecular (CSIC-UAM). Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma. Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Received 14 December 2006; returned to author for revision 4 January 2007; accepted 1 February 2007

Available online 23 March 2007

Abstract

Brefeldin A is a macrolide compound that interferes with the secretory pathway and also affects protein synthesis in mammalian cells. As a result, this antibiotic impedes the maturation of viral glycoproteins of enveloped viruses and viral genome replication in several virus species. In the present work, we show that translation of subgenomic mRNA from Sindbis virus, which in contrast to cellular translation is resistant to brefeldin A after prolonged treatment. The phosphorylation of eIF2 α as a result of brefeldin A treatment correlates with the inhibition of cellular translation, while late viral protein synthesis is resistant to this phosphorylation. The effect of brefeldin A on Sindbis virus replication was also examined using a Sindbis virus replicon. Although brefeldin A delayed viral RNA synthesis, translation by non-replicative viral RNAs was not affected, reinforcing the idea that brefeldin A delays viral RNA replication, but does not directly affect Sindbis virus protein synthesis.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Brefeldin A; Sindbis virus; Cellular translation; Viral protein synthesis; Sindbis virus replication

Sindbis virus (Mirazimi et al., 1996) is the prototype member of the *Alphavirus* genus of the *Togaviridae* family. The genome, a positive-strand non-segmented RNA of almost 12 kb, consists of two open reading frames: the first two-thirds encode non-structural proteins (nsPs), while the remaining third encodes structural proteins (Frolov, 2004; Strauss and Strauss, 1994). The genomic 49S RNA also serves as a template for the synthesis of negative RNA which is used to generate more genome copies and to transcribe the subgenomic 26S mRNA from an internal promoter (Strauss and Strauss, 1994). The lytic cycle of SV infection has two well-defined stages. In the first one, SV genomic RNA is translated to render the non-structural proteins, nsp1, 2, 3 and 4. These proteins are required for viral replication and transcription (Kaariainen and Ahola, 2002). At about 2–4 h post infection (h p.i.), the pattern of protein synthesis drastically changes and subgenomic RNA translation increases notably, while genomic RNA is encapsidated in new virus particles. In vertebrate cells, a rapid inhibition of host protein synthesis occurs at this time of infection (Frolov and Schlesinger, 1994, 1996; Strauss and Strauss, 1994; Ventoso et al., 2006). The ability of a virus to inhibit the translation of cellular mRNAs under conditions in which viral mRNAs are translated has been

observed in mammalian and other higher eukaryotic cells for a variety of positive- and negative-strand RNA viruses, including poliovirus and influenza virus, and for many species of DNA viruses such as adenoviruses, herpesviruses and poxviruses (Bushell and Sarnow, 2002; Schneider and Mohr, 2003; Thompson and Sarnow, 2000). How this blockade is accomplished remains still poorly understood in many cases, and different viruses may use different mechanisms to achieve this differential inhibition of translation (Bushell and Sarnow, 2002; Schneider and Mohr, 2003; Thompson and Sarnow, 2000).

Brefeldin A (BFA) is a macrolide compound capable of disrupting the vesicular system and blocking glycoprotein secretion in eukaryotic cells (Klausner et al., 1992; Lee and Linstedt, 1999; Nebenfuhr et al., 2002; Pelham, 1991; Sata et al., 1999). The molecular target of BFA is a subset of Sec7-type GTP-exchange factors (GEFs), which activate a GTP-binding protein known as ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) (Jackson and Casanova, 2000). ARF1 recruits the COPI coat and AP-1/clathrin coat protein complexes involved in the formation of transport vesicles (Scales et al., 2000). BFA inhibits the GDP-GTP-exchange reaction between GEF and ARF1, leading to the inhibition of ARF activation (Jackson and Casanova, 2000; Renault et al., 2003). As a consequence, coat proteins are released from Golgi membranes, provoking the loss of control of fusion and budding membranes (Klausner et al., 1992; Kreis

* Corresponding author.

E-mail address: smolina@cbm.uam.es (S. Molina).

et al., 1995; Lippincott-Schwartz et al., 1990, 1991; Orci et al., 1991; Pelham, 1991; Scales et al., 2000; Torii et al., 1995). BFA possesses antiviral activity against enveloped viruses since it impedes the maturation of viral glycoproteins and the production of infectious particles which mature on the plasma membrane or within the cell (Dasgupta and Wilson, 2001; Irurzun et al., 1993; Madan et al., 2005; Mirazimi et al., 1996; Suikkanen et al., 2003). The replication of viruses such as poliovirus or vesicular stomatitis virus is inhibited by BFA since RNA replication of these viruses requires continuous synthesis of lipids to provide new membranes to which viral replication complexes attach. Therefore, this compound acts against some non-enveloped viruses, interfering with genome replication, which requires an intact vesicular system (Cuconati et al., 1998; Gazina et al., 2002; Irurzun et al., 1992, 1993; Maynell et al., 1992). BFA also decreases protein synthesis in culture cells. Thus, BFA treatment of rat GH3 pituitary cells leads to an inhibition of protein synthesis at the initiation level (Fishman and Curran, 1992; Mellor et al., 1994). Presumably, this effect is due to the stress situation of the endoplasmic reticulum caused by the disorganization of the membrane system (Liu and Kaufman, 2003; Mellor et al., 1994; Prostko et al., 1993). We have now analyzed the action of BFA on the translation of BHK-21 cells and SV-infected cells and also tested the effect of BFA on SV mRNA synthesis. Our results indicate that BFA delays viral translation by retarding viral RNA synthesis.

Results

Effect of BFA on protein synthesis in BHK-21 and SV-infected cells

To test the effect of BFA on protein synthesis, SV-infected or uninfected BHK-21 cells were treated with different concentrations of BFA after viral adsorption. Concentrations of BFA ranged from 1 to 20 $\mu\text{g/ml}$. Cellular (Fig. 1A) and late viral protein synthesis (Fig. 1B) were analyzed after 6 h of BFA treatment by metabolic labeling with ^{35}S -Met/Cys. At all the concentrations analyzed, BFA induced an inhibition of cellular protein synthesis of around 80%, whereas very little effect was observed on viral translation. Notably, SV protein synthesis was not inhibited at the highest concentration of BFA whereas cellular translation was strongly blocked by only 1 $\mu\text{g/ml}$ of this antibiotic. The comparative activity of BFA on cellular and viral protein synthesis is represented in Fig. 1C. There is a clear differential inhibition caused by BFA on cellular as compared to subgenomic SV mRNA translation.

Our next aim was to examine the action of BFA on the early and late phases of the viral cycle. This was achieved by adding BFA after virus adsorption or at 2 h p.i. and analyzing the synthesis of structural viral proteins at 2, 4 and 6 h p.i. by protein radiolabeling (Fig. 2A). As a control, translation in untreated cells infected by SV, as well as in non-infected cells (Fig. 2B), was estimated. Addition of BFA after viral adsorption caused 91% inhibition of viral translation at 2 h p.i. This inhibition decreased throughout the course of infection and was only 10% at 6 h p.i. However, when BFA was added at 2 h p.i.,

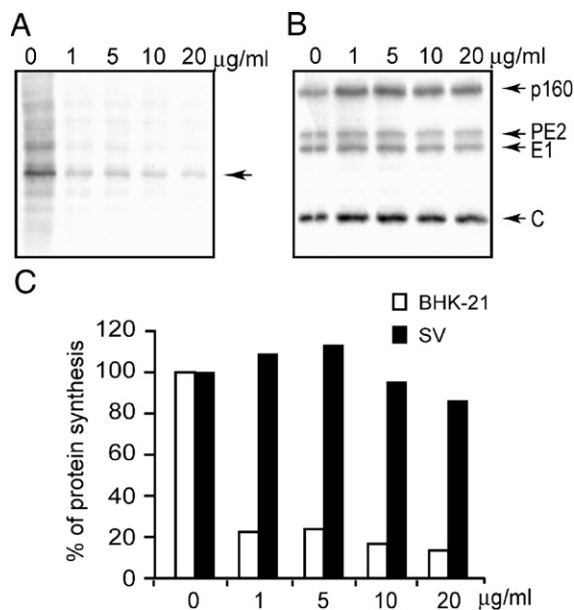


Fig. 1. Effect of BFA on cellular and SV late protein synthesis. Mock-infected (A) or SV-infected BHK cells (multiplicity of infection, 20 PFU/cell) (B) were treated for 6 h and then labeled with ^{35}S -Met/Cys during 30 min in the presence of the same concentrations of BFA. Samples were processed by SDS-PAGE, fluorography and autoradiography as indicated in Materials and methods. P160, precursor of SV structural proteins; PE2, precursor of E2 glycoprotein; E1, mature SV E1 glycoprotein. (C) SV C protein and a cellular protein, both indicated with arrows, were subjected to densitometric analysis to estimate the percentage of protein synthesis compared to untreated controls.

the reduction in viral translation was about 39% at the beginning of infection, and no differences in protein synthesis with respect to the untreated cells were observed at 6 h p.i. Therefore, BFA only delays but does not inhibit synthesis of SV structural proteins.

In culture cells, such as rat GH3 pituitary cells, BFA induces eIF2 α phosphorylation, which could be responsible for the inhibition of translation (Mellor et al., 1994). Therefore, phosphorylation of eIF2 α during BFA treatment and after SV infection of BFA-treated or non-treated cells was analyzed (Fig. 3). To avoid the potential inhibition of virus entry by BFA, this compound was added after virus adsorption. Cells were collected at the times indicated in the figure, and phosphorylated or total eIF2 were detected by Western blotting with specific antibodies. As a control, eIF2 α phosphorylation was estimated in mock-infected non-BFA-treated cells. In BFA-treated cells, the phosphorylated form is detectable from 2 h of treatment, both in mock-infected and SV-infected cells, while phosphorylation of eIF2 α in SV-infected non-treated cells was detected from 4 h p.i., as described previously (Ventoso et al., 2006). In addition, eIF2 remains phosphorylated at 4 and 6 h p.i. in SV-infected BFA-treated cells when SV translation reaches the levels of non-treated controls. This result suggests that, although in SV-infected BFA-treated cells the eIF2 α phosphorylation was initially induced by BFA treatment, it did not affect SV RNA translation. On the other hand, inhibition of cellular protein synthesis can be observed after 2 h of treatment with BFA, which coincides with an increase in the phosphorylated form of eIF2 α .

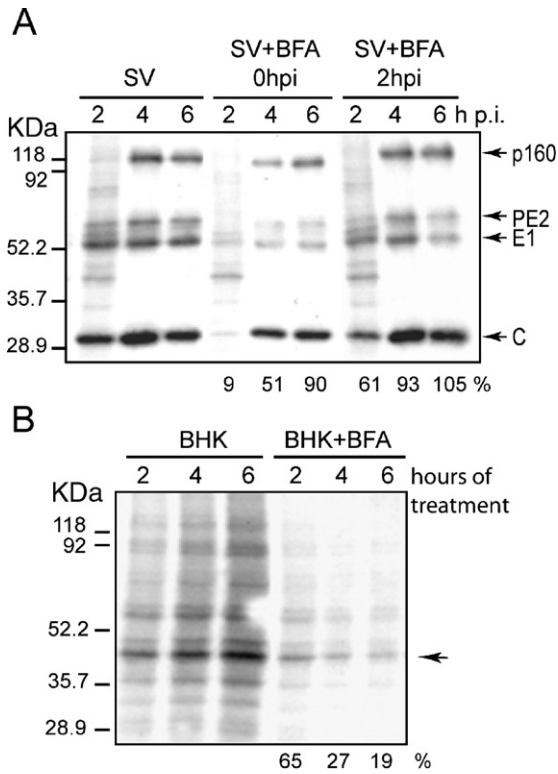


Fig. 2. Kinetics of cellular and SV late protein synthesis: effect of BFA. (A) SV-infected cells were treated at 0 or 2 h p.i. and radiolabeled at 2, 4 and 6 h p.i. during 30 min. (B) Mock-infected cells were treated with BFA and radiolabeled after 2, 4 or 6 h of treatment. In both cases, BFA was present during labeling. Samples were processed by SDS-PAGE, followed by fluorography and autoradiography. The numbers below each lane represent the percentage of protein synthesis with respect to non-treated controls calculated by densitometry of SV C protein and a cellular protein, indicated by the arrows. P160: precursor of SV structural proteins; PE2, precursor of E2 glycoprotein; E1, mature SV E1 glycoprotein.

To analyze the effect of BFA on translation directed by SV genomic RNA, a recombinant virus SV-Luc with the luciferase gene inserted into the nsP3 sequence was employed (Bick et al., 2003). BHK cells were treated with 5 μ g/ml of BFA at 2 h before infection with SV-Luc, after virus adsorption, or at 2 h post infection. Although in SV-infected cells, the synthesis of non-structural proteins ceases at 4 h p.i., SV-luc has a delayed early phase. For this reason, luciferase activity was measured at 2, 4 and 6 h p.i., the time when genomic RNA is being translated (Ventoso et al., 2006). The greatest inhibition of luciferase

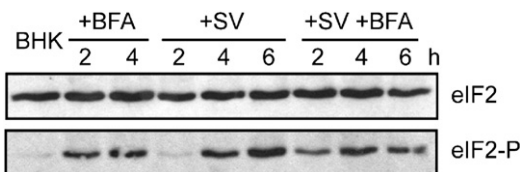


Fig. 3. Phosphorylation of eIF2 α . SV-infected or mock-infected cells were treated with BFA, added after virus adsorption. After 2, 4 or 6 h, cells were collected in sample buffer and subjected to SDS-PAGE and Western blotting, as described in Materials and methods, using specific antibodies for the phosphorylated (eIF2-P) and the non-phosphorylated form of eIF2. As a control, non-treated mock-infected BHK cells were used.

synthesis occurred when cells were treated with BFA before infection (Fig. 4A). When BFA was present from the beginning of infection or from 2 h p.i., luciferase synthesis was about 70% as compared to the non-treated control at 4 h p.i., and no effect was observed at 6 h p.i. These results indicate that the expression of genomic and subgenomic mRNAs of SV is delayed by BFA treatment. Interestingly, these data also suggest that the inhibitory effect of BFA would not be correlated with

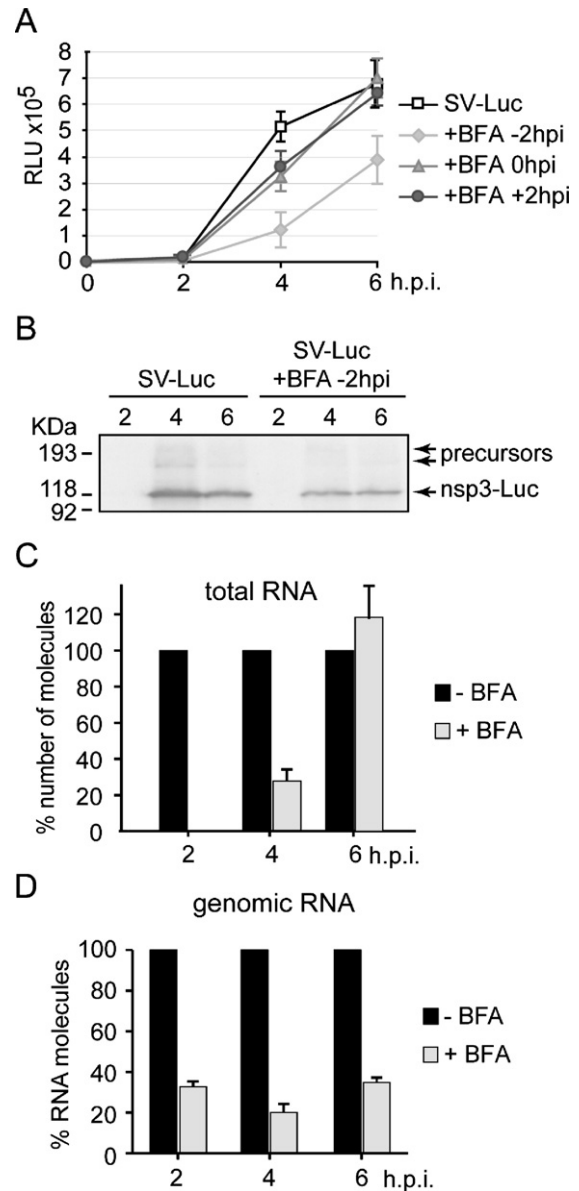


Fig. 4. Effect of BFA on SV non-structural proteins and RNA synthesis. SV-luc infected cells were treated with 5 μ g/ml of BFA 2 h before infection and at 0 and 2 h p.i. Cells were collected at 2, 4 and 6 h p.i. to measure luciferase activity (A) or the amount of luciferase, fused to nsP3 or as part of the nsPs polyprotein by Western blot using a rabbit polyclonal antiserum (B), as described in Materials and methods. (C) Quantitation of total RNA and genomic RNA (D) molecules in SV-infected cells in the presence or absence of 5 μ g/ml of BFA. BFA was added at 0 h p.i. and cells were collected at 2, 4 and 6 h p.i. RNA was extracted and quantified by real-time PCR as described in Materials and methods. Data are presented as percentages of number of molecules of RNA in BFA-treated with respect to non-treated cells.

eIF2 α phosphorylation since this phosphorylation inhibits translation of SV genomic RNA (Ventoso et al., 2006). To assay if BFA alters the proteolytic processing of early SV proteins, BHK cells, untreated or treated with 5 μ g/ml BFA for 2 h, were infected with SV-Luc. At 2, 4 and 6 h p.i., cells were collected and the amount of luciferase fused with the nsP3, as well as the uncleaved precursors, was detected by Western blotting (Fig. 4B). The levels of unprocessed polyprotein were undetectable in BFA-treated cells or proportional to those detected in the non-treated control, indicating that this compound does not affect the proteolytic cleavage of SV non-structural proteins.

Effects of BFA on SV RNA synthesis

We next determined the effect of BFA on SV RNA synthesis. In this experiment, SV-infected BHK cells were treated with BFA immediately after infection, and at 2, 4 and 6 h p.i. RNA was extracted and quantitated by real-time PCR, using specific oligonucleotides for measuring total RNA (Fig. 4C) or genomic RNA (Fig. 4D). The amount of total RNA in BFA-treated cells was lower than in non-treated cells during the initial hours of infection. However, at later times a similar amount of total RNA was detected in BFA-treated and non-treated cells. These findings suggest that SV replication is delayed by BFA, thus accounting for the decreased synthesis of both structural and non-structural proteins. Analysis of genomic RNA levels revealed that they were lower in BFA-treated cells during the entire treatment period, which suggests that BFA interferes with SV RNA synthesis rather than protein synthesis.

Effect of BFA on viral replication

Since BFA blocks genome replication of some viruses (Gazina et al., 2002; Irurzun et al., 1992, 1993; Maynell et al., 1992), our next aim was to determine whether BFA inhibited SV replication using the SV replicon *repL26S C-luc* (Fig. 5A). BHK cells were treated for 4 h with 5 μ g/ml BFA and then electroporated with *repL26S C-luc*. BFA was maintained after electroporation, and cells were collected at 2, 4 and 6 h p.e. Luciferase activity, which reflects the level of proteins translated from subgenomic mRNA, is shown in Fig. 5B. An acute effect of BFA can be observed within the first hours of electroporation, while at 6 h p.e. the luciferase activity is similar to that found in untreated controls. In addition, the effect of BFA on translation of the non-replicative RNAs *49S-luc* and *L26SC-luc* was assayed. A schematic representation of these RNAs is shown in Fig. 5A. Both RNAs were electroporated in BHK cells previously treated with BFA for 4 h. BFA was maintained during and after electroporation, and

cells were collected at 2, 4 and 6 h p.e. to measure luciferase activity (Figs. 5C and D). In both cases, luciferase activity in BFA-treated cells was higher than in untreated control cells,

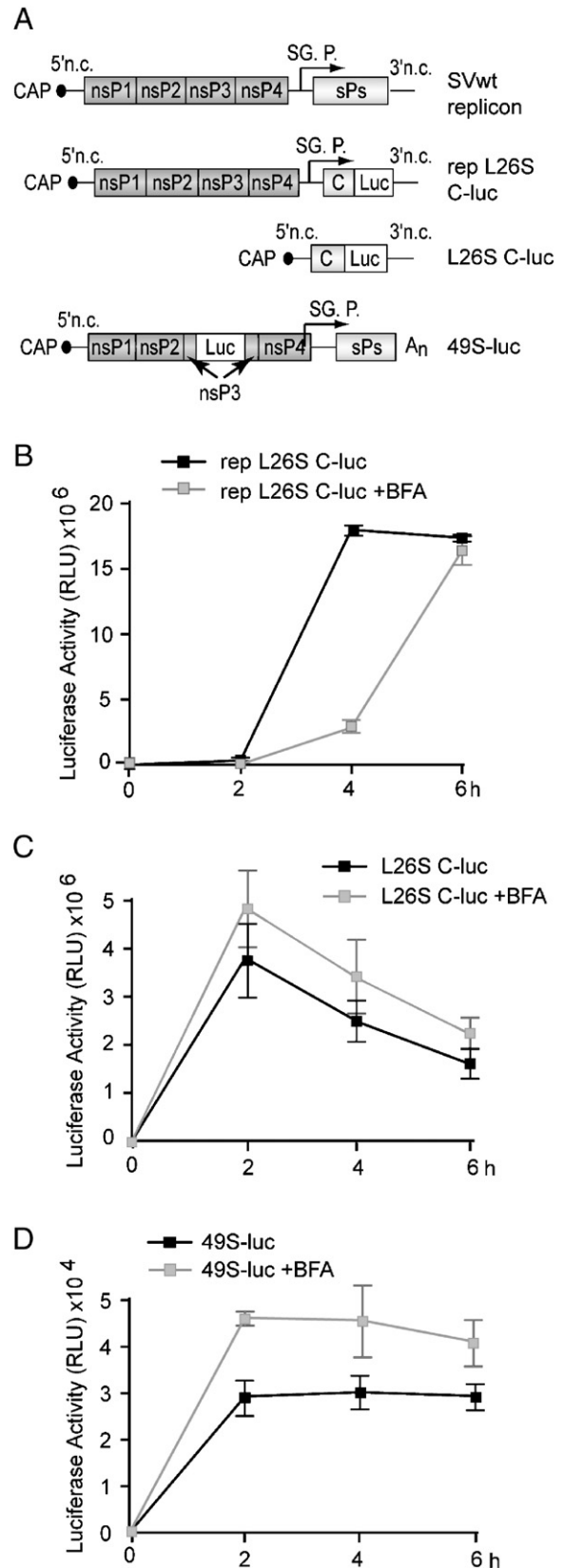


Fig. 5. Effect of BFA on SV replication. (A) Schematic representation of the different viral RNAs *repL26S C-luc*, *L26SC-luc* and *49S-luc*. (B) Luciferase activity at 2, 4 and 6 h p.e. of BHK cells with the replicative RNA *repL26S C-luc*, in the presence or absence of BFA. (C) and (D) show the measurement of luciferase activity at 2, 4 and 6 h p.e. in BHK cells electroporated with the non-replicative RNAs *L26SC-luc* and *49S-luc*, respectively, in the presence or absence of BFA.

indicating that BFA had no inhibitory effect on the translation of non-replicative RNAs. The lack of inhibition of SV 49S-derived RNA by BFA is consistent with the results obtained with the SV-Luc virus (Fig. 4A).

These findings suggest that BFA interferes with the SV replicative RNA but does not inhibit the non-replicative forms, supporting the idea that the action of BFA on SV is due to the delay in RNA synthesis.

Discussion

The fungal metabolite BFA is a well characterized inhibitor of the secretory pathway in mammalian cells (Lippincott-Schwartz et al., 1991; Orci et al., 1991; Pelham, 1991). BFA also causes a potent inhibition of cellular protein synthesis, presumably due to the unfolded protein response (UPR) triggered in the endoplasmic reticulum as a consequence of disorganization of the membrane system (Fishman and Curran, 1992; Liu and Kaufman, 2003; Mellor et al., 1994; Prostko et al., 1993). Notably, SV protein synthesis is maintained after a prolonged treatment with this compound, thus reflecting a differential behaviour between cellular and viral mRNAs. Indeed, BFA strongly inhibits cellular protein synthesis, whereas SV translation is only slightly delayed. Notably, the amount of phosphorylated eIF2 α increases after 2 h treatment of BHK cells with BFA, in agreement with previous results reported for GH3 pituitary cells (Mellor et al., 1994). This finding can be interpreted as a consequence of UPR activation (Dinter and Berger, 1998; Harding et al., 1999; Lee and Linstedt, 1999). However, this phosphorylation might not be the sole cause of translation inhibition induced by BFA since cellular protein synthesis is not completely abrogated. Furthermore, the synthesis of luciferase from SV-Luc and the SV-derived genomic RNA in BFA-treated cells is not inhibited, and the translatability of exogenous viral mRNAs transfected in BFA-treated cells was not affected (data not shown).

On the other hand, SV protein synthesis is reduced in the presence of BFA only at early times after infection. Viral translation recovers throughout the time of treatment, so that the levels of SV protein synthesis reach those observed in untreated infected cells. The inhibitory effect of BFA is lower when added later during infection, suggesting that BFA has an indirect effect on SV protein synthesis. Previous studies that analyzed the action of BFA on togavirus protein synthesis added this compound or analyzed protein synthesis at later times of infection, thus, no effect of BFA was observed on genomic nor subgenomic RNA translation (Carleton and Brown, 1996; Da Costa and Rebello, 1999; Madan et al., 2005). Interestingly, the amount of genomic RNA is lower in the presence of BFA as compared to untreated cells, indicating that BFA interferes with viral RNA replication. This possibility is reinforced by the observation that BFA only reduced the expression of the SV-derived replicon, whereas non-replicative mRNAs were translated under these conditions. The finding that the 49S non-replicative RNA is not inhibited by BFA treatment agrees with the idea that the action of BFA on SV is exerted on replication. The resistance of 26S mRNA to BFA, which increases eIF2 α

phosphorylation, could be due to its hairpin structures that may provide translational resistance to the conditions induced by this compound (Ventoso et al., 2006).

The action of BFA on the vesicular system impairs the maturation of viral glycoproteins, suppressing the formation of viral particles of enveloped viruses (Dasgupta and Wilson, 2001; Irurzun et al., 1993; Madan et al., 2005; Mirazimi et al., 1996; Suikkanen et al., 2003). In addition, BFA also has an inhibitory effect on replication of many non-enveloped viruses without glycoproteins, such as enteroviruses and rhinoviruses. In these cases, BFA abrogates viral replication since this process is associated with the formation of vesicular structures (Cuconati et al., 1998; Gazina et al., 2002; Irurzun et al., 1992; Maynell et al., 1992). BFA is known to affect the control of fusion and budding of membranes, and so also influences the process of vacuole formation (Klausner et al., 1992; Kreis et al., 1995; Lippincott-Schwartz et al., 1990, 1991; Orci et al., 1991; Pelham, 1991; Scales et al., 2000; Torii et al., 1995). Replication of SV alters intracellular membranes, creating new vesicles which are linked to viral RNA synthesis (Kujala et al., 2001; Peranen et al., 1995; Salonen et al., 2005). Most probably, BFA interferes with the formation of the new vesicles by decreasing the replication efficiency, and hence affecting viral protein synthesis (Cuconati et al., 1998; Irurzun et al., 1992; Maynell et al., 1992). This hypothesis also explains the differential effect observed when BFA is added at different times after infection, with the greatest effect when BFA was present before infection. When SV infection takes place in cells previously treated with BFA, the vesicular system is disorganized before the replicative complexes are formed. In this case, replication may be more affected than when BFA is added after virus adsorption or at 2 h p.i. The formation of the vesicles needed for viral replication before BFA addition may result in a lower inhibition of replication. However, this inhibition is partial even when BFA is added before infection. Thus, viral replication is not completely abolished by the presence of BFA since RNA and protein synthesis increases throughout infection. Therefore, BFA may disturb and delay, but not completely block, the formation of viral replication complexes. In such conditions, more time is needed to reach adequate levels of SV non-structural proteins in BFA-treated cells. Thus, the amount of viral RNA and protein synthesis finally recovered in the presence of BFA and at 6 h p.i. is comparable to non-treated controls.

Taken together, these results provide further insight into the effect of the macrolide compound BFA on alphavirus infection.

Materials and methods

Cell culture and viruses

Baby hamster kidney (BHK-21) cells were grown at 37 °C in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS) and non-essential amino acids. Wild-type (wt) SV and SV-Luc stocks were obtained from the cDNA clones pT7SVwt (Hahn et al., 1992; Sanz and Carrasco, 2001) and pToto1101/Luc, respectively (generously provided by Charles M. Rice, Rockefeller University, NY)

(Bick et al., 2003). They were propagated and titered in BHK-21 cultures.

Plasmids

The replicon *repL26S C-luc* was obtained by *in vitro* transcription from the plasmid pT7 *repL26S C-luc*. This plasmid is derived from pT7SVwt and contains the luciferase gene between the SV C protein sequence and the SV 3' non-coding region with deletion of the sequence encoding for E3, E2, 6K and E1 proteins. The first three codons encoding for E3 are maintained to facilitate the autoproteolytic cleavage of C protein.

The non-replicative RNA *49S-luc* was obtained by *in vitro* transcription from *pToto1101/Luc* digested with *Bss*HIII, which eliminates the 3' non-coding region. The resulting RNA was polyadenylated post-transcriptionally with PolyA polymerase (Invitrogen).

The non-replicative RNA *L26SC-luc* was obtained by *in vitro* transcription from pT7 C+ Luc. This plasmid contains the subgenomic sequence from *repL26S C-luc* after the T7 promoter sequence, which permits the *in vitro* production of this mRNA.

Viral infections

BHK-21 cells were infected with wild-type SV or SV-Luc at a multiplicity of infection of 10 PFU/cell. After 30 min of adsorption, the medium was removed and culture plates were incubated with fresh DMEM supplemented with 5% FCS.

Effects of different compounds on SV and cellular translation

BFA (5 µg/ml) (Sigma) was added to the SV-infected cultures at different h p.i. At the indicated times, proteins were labeled for 30 min with 200 µl methionine/cysteine-free DMEM supplemented with 1 µl Trans label [³⁵S]-Met/Cys (15 mCi/ml, Amersham Biosciences) per well in the presence or absence of the inhibitor. Cells were collected in sample buffer, boiled for 4 min and analyzed by SDS-PAGE and fluorography.

Western blot analysis

The phosphorylation state of the translation initiation factor eIF2 was determined by Western blotting (Ventoso et al., 2006), as well as the proteolytic cleavage of the nsPs. BHK-21 cells were infected, treated with BFA or infected and treated with BFA after virus adsorption. At different h p.i., cells were collected in sample buffer and proteins were fractionated by SDS-PAGE in 15% polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes by wet transfer. Membranes were blocked with PBS containing 5% low-fat dry milk. Anti-eIF2 (Santa Cruz), anti-phosphorylated-eIF2 (Biosource) or anti-Luciferase (Promega) antibodies were then added, and the membranes were washed with PBS containing 0.2% Tween 20. Goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated antibodies (Pierce) and the ECL kit (Amersham Biosciences) were used to detect bound antibodies. Chemiluminescence was detected by exposure to Agfa X-ray film.

Measurement of luciferase activity

BHK-21 cells were infected with SV-Luc or electroporated with 20 µg of RNA. At different hours post-electroporation (h p. e.), cells were lysed in a buffer containing 0.5% Triton X-100, 25 mM glycylglycine (pH 7.8) and 1 mM dithiothreitol. Luciferase activity was determined using a Monolight 2100 apparatus (Analytical Luminescence Laboratory), as described previously (Ventoso and Carrasco, 1995).

Analysis of mRNA by real-time PCR

SV RNA levels in infected cells were determined by real-time quantitative reverse transcription (RT)-PCR as previously described (Alvarez et al., 2003; Castello et al., 2006). Briefly, total RNA was extracted from $2^5 \times 10$ cells at the times indicated in each figure, using the RNeasy commercial kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations. The isolated RNA was resuspended in 30 µl of nuclease-free water, and 3 µl was subjected to analysis. Real-time quantitative RT-PCR was performed with the LightCycler thermal cycler system (Roche Diagnostics) using the RNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics) as described (Alvarez et al., 2003; Castello et al., 2006). The primers C-forward (5'-GAA CGA GGA CG GAGA TGT CAT CG-3') and C-reverse (5'-CAG CGC CAC CGA GGA CTA TCG C-3') were employed to quantify the total SV RNA. Data analysis was done using the Roche Molecular Biochemicals LightCycler software, version 3.3. The specificity of the amplification reactions was confirmed by analyzing the corresponding melting curves.

Acknowledgments

This study was supported by Grant (BFU2006-02182/BMC) from DGICYT and an Institutional Grant awarded to the Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" by the Fundación Ramón Areces.

References

- Alvarez, E., Menendez-Arias, L., Carrasco, L., 2003. The eukaryotic translation initiation factor 4GI is cleaved by different retroviral proteases. *J. Virol.* 77 (23), 12392–12400.
- Bick, M.J., Carroll, J.W., Gao, G., Goff, S.P., Rice, C.M., MacDonald, M.R., 2003. Expression of the zinc-finger antiviral protein inhibits alphavirus replication. *J. Virol.* 77 (21), 11555–11562.
- Bushell, M., Sarnow, P., 2002. Hijacking the translation apparatus by RNA viruses. *J. Cell Biol.* 158 (3), 395–399.
- Carleton, M., Brown, D.T., 1996. Events in the endoplasmic reticulum abrogate the temperature sensitivity of Sindbis virus mutant ts23. *J. Virol.* 70 (2), 952–959.
- Castello, A., Sanz, M.A., Molina, S., Carrasco, L., 2006. Translation of Sindbis virus 26S mRNA does not require intact eukaryotic initiation factor 4G. *J. Mol. Biol.* 355 (5), 942–956.
- Cuconati, A., Molla, A., Wimmer, E., 1998. Brefeldin A inhibits cell-free, de novo synthesis of poliovirus. *J. Virol.* 72 (8), 6456–6464.
- Da Costa, L.J., Rebello, M.A., 1999. Effect of brefeldin A on Mayaro virus replication in *Aedes albopictus* and Vero cells. *Acta Virol.* 43 (6), 357–360.
- Dasgupta, A., Wilson, D.W., 2001. Evaluation of the primary effect of brefeldin

- A treatment upon herpes simplex virus assembly. *J. Gen. Virol.* 82 (Pt 7), 1561–1567.
- Dinter, A., Berger, E.G., 1998. Golgi-disturbing agents. *Histochem. Cell Biol.* 109 (5–6), 571–590.
- Fishman, P.H., Curran, P.K., 1992. Brefeldin A inhibits protein synthesis in cultured cells. *FEBS Lett.* 314 (3), 371–374.
- Frolov, I., 2004. Persistent infection and suppression of host response by alphaviruses. *Arch. Virol. Suppl.* (18), 139–147.
- Frolov, I., Schlesinger, S., 1994. Translation of Sindbis virus mRNA: effects of sequences downstream of the initiating codon. *J. Virol.* 68 (12), 8111–8117.
- Frolov, I., Schlesinger, S., 1996. Translation of Sindbis virus mRNA: analysis of sequences downstream of the initiating AUG codon that enhance translation. *J. Virol.* 70 (2), 1182–1190.
- Gazina, E.V., Mackenzie, J.M., Gorrell, R.J., Anderson, D.A., 2002. Differential requirements for COPI coats in formation of replication complexes among three genera of *Picornaviridae*. *J. Virol.* 76 (21), 11113–11122.
- Hahn, C.S., Hahn, Y.S., Braciale, T.J., Rice, C.M., 1992. Infectious Sindbis virus transient expression vectors for studying antigen processing and presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (7), 2679–2683.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D., 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397 (6716), 271–274.
- Irurzun, A., Perez, L., Carrasco, L., 1992. Involvement of membrane traffic in the replication of poliovirus genomes: effects of brefeldin A. *Virology* 191 (1), 166–175.
- Irurzun, A., Perez, L., Carrasco, L., 1993. Brefeldin A blocks protein glycosylation and RNA replication of vesicular stomatitis virus. *FEBS Lett.* 336 (3), 496–500.
- Jackson, C.L., Casanova, J.E., 2000. Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol.* 10 (2), 60–67.
- Kaariainen, L., Ahola, T., 2002. Functions of alphavirus nonstructural proteins in RNA replication. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 71, 187–222.
- Klausner, R.D., Donaldson, J.G., Lippincott-Schwartz, J., 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* 116 (5), 1071–1080.
- Kreis, T.E., Lowe, M., Pepperkok, R., 1995. COPs regulating membrane traffic. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 677–706.
- Kujala, P., Ikaheimonen, A., Ehsani, N., Vihinen, H., Auvinen, P., Kaariainen, L., 2001. Biogenesis of the Semliki Forest virus RNA replication complex. *J. Virol.* 75 (8), 3873–3884.
- Lee, T.H., Linstedt, A.D., 1999. Osmotically induced cell volume changes alter anterograde and retrograde transport, Golgi structure, and COPI dissociation. *Mol. Biol. Cell* 10 (5), 1445–1462.
- Lippincott-Schwartz, J., Donaldson, J.G., Schweizer, A., Berger, E.G., Hauri, H.P., Yuan, L.C., Klausner, R.D., 1990. Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* 60 (5), 821–836.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L., Tipper, C., Amherdt, M., Orci, L., Klausner, R.D., 1991. Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* 67 (3), 601–616.
- Liu, C.Y., Kaufman, R.J., 2003. The unfolded protein response. *J. Cell Sci.* 116 (Pt 10), 1861–1862.
- Madan, V., Sanz, M.A., Carrasco, L., 2005. Requirement of the vesicular system for membrane permeabilization by Sindbis virus. *Virology* 332 (1), 307–315.
- Maynell, L.A., Kirkegaard, K., Klymkowsky, M.W., 1992. Inhibition of poliovirus RNA synthesis by brefeldin A. *J. Virol.* 66 (4), 1985–1994.
- Mellor, H., Kimball, S.R., Jefferson, L.S., 1994. Brefeldin A inhibits protein synthesis through the phosphorylation of the alpha-subunit of eukaryotic initiation factor-2. *FEBS Lett.* 350 (1), 143–146.
- Mirazimi, A., von Bonsdorff, C.H., Svensson, L., 1996. Effect of brefeldin A on rotavirus assembly and oligosaccharide processing. *Virology* 217 (2), 554–563.
- Nebenfuhr, A., Ritzenthaler, C., Robinson, D.G., 2002. Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol.* 130 (3), 1102–1108.
- Orci, L., Tagaya, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Donaldson, J.G., Lippincott-Schwartz, J., Klausner, R.D., Rothman, J.E., 1991. Brefeldin A, a drug that blocks secretion, prevents the assembly of non-clathrin-coated buds on Golgi cisternae. *Cell* 64 (6), 1183–1195.
- Pelham, H.R., 1991. Multiple targets for brefeldin A. *Cell* 67 (3), 449–451.
- Peranen, J., Laakkonen, P., Hyvonen, M., Kaariainen, L., 1995. The alphavirus replicase protein nsP1 is membrane-associated and has affinity to endocytic organelles. *Virology* 208 (2), 610–620.
- Prostko, C.R., Brostrom, M.A., Brostrom, C.O., 1993. Reversible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 alpha in response to endoplasmic reticular signaling. *Mol. Cell Biochem.* 127–128, 255–265.
- Renault, L., Guibert, B., Cherfils, J., 2003. Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature* 426 (6966), 525–530.
- Salonen, A., Ahola, T., Kaariainen, L., 2005. Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 285, 139–173.
- Sanz, M.A., Carrasco, L., 2001. Sindbis virus variant with a deletion in the 6K gene shows defects in glycoprotein processing and trafficking: lack of complementation by a wild-type 6K gene in *trans*. *J. Virol.* 75 (16), 7778–7784.
- Sata, M., Moss, J., Vaughan, M., 1999. Structural basis for the inhibitory effect of brefeldin A on guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (6), 2752–2757.
- Scales, S.J., Gomez, M., Kreis, T.E., 2000. Coat proteins regulating membrane traffic. *Int. Rev. Cytol.* 195, 67–144.
- Schneider, R.J., Mohr, I., 2003. Translation initiation and viral tricks. *Trends Biochem. Sci.* 28 (3), 130–136.
- Strauss, J.H., Strauss, E.G., 1994. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.* 58 (3), 491–562.
- Suikkanen, S., Antila, M., Jaatinen, A., Vihinen-Ranta, M., Vuonto, M., 2003. Release of canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology* 316 (2), 267–280.
- Thompson, S.R., Sarnow, P., 2000. Regulation of host cell translation by viruses and effects on cell function. *Curr. Opin. Microbiol.* 3 (4), 366–370.
- Torii, S., Banno, T., Watanabe, T., Ikehara, Y., Murakami, K., Nakayama, K., 1995. Cytotoxicity of brefeldin A correlates with its inhibitory effect on membrane binding of COP coat proteins. *J. Biol. Chem.* 270 (19), 11574–11580.
- Ventoso, I., Carrasco, L., 1995. A poliovirus 2A (pro) mutant unable to cleave 3CD shows inefficient viral protein synthesis and transactivation defects. *J. Virol.* 69 (10), 6280–6288.
- Ventoso, I., Sanz, M.A., Molina, S., Berlanga, J.J., Carrasco, L., Esteban, M., 2006. Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2alpha phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes Dev.* 20 (1), 87–100.

Viral Translation Is Coupled to Transcription in Sindbis Virus-Infected Cells[∇]

Miguel A. Sanz,* Alfredo Castelló, and Luis Carrasco

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Received 16 November 2006/Accepted 11 April 2007

During the late phase of Sindbis virus infection, the viral subgenomic mRNA is translated efficiently in BHK cells, whereas host protein synthesis is inhibited. However, transfection of in vitro-generated Sindbis virus subgenomic mRNA leads to efficient translation in uninfected BHK cells, whereas it is a poor substrate in infected cells. Therefore, the structure of the subgenomic mRNA itself is not sufficient to confer its translatability in infected cells. In this regard, translation of the subgenomic mRNA requires synthesis from the viral transcription machinery. The lack of translation of transfected viral mRNAs in infected cells is not due to their degradation nor is it a consequence of competition between viral transcripts and transfected mRNAs, because a replicon that cannot produce subgenomic mRNA also interferes with exogenous mRNA translation. Interestingly, subgenomic mRNA is translated more efficiently when it is transfected into uninfected cells than when it is transcribed from a transfected replicon. Finally, a similar behavior was observed for other RNA viruses, such as vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. These findings support the notion that translation is coupled to transcription in cells infected with different animal viruses.

In cells infected with animal viruses, the regulation of translation plays a pivotal role in both viral replication and gene expression. This is the case for Sindbis virus (SV), a prototype member of the *Alphavirus* genus belonging to the *Togaviridae* family (36). The SV lytic cycle comprises two distinct translation stages. In the early phase, synthesis of viral nonstructural proteins (nsPs) takes place alongside host mRNA translation. However, a few hours later, cellular protein synthesis is strongly inhibited whereas viral structural proteins (sPs) are synthesized in abundance. Synthesis of the SV sPs is not necessary to trigger the inhibition of translation (8). Noncytopathic SV variants that do not fully block translation contain mutations in the nsp region and particularly in the nsp2 gene, suggesting that viral replication is implicated in the abrogation of host translation (1, 7, 11, 16, 30, 31). However, an SV variant that efficiently induces the shutoff of cellular mRNAs despite a low replication rate has been described previously (11). Replication of cytopathic SV induces a cellular stress response, leading to phosphorylation of the α subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 α) to block the translation machinery. In particular, protein kinase R is activated in SV-infected cells, thus promoting the phosphorylation of this initiation factor. However, protein synthesis is also inhibited in cells that lack the protein kinase R gene, so other inhibitory pathways may be activated during SV infection (17, 32, 39). It has been proposed that, during Semliki Forest virus infection, assembly of stress granules after eIF2 α phosphorylation and their localized disassembly may lead to general translational arrest that only viral subgenomic mRNA can elude (23). The alteration of intracel-

lular ionic concentrations has also been proposed as a mechanism that modulates translation in alphavirus-infected cells. Thus, subgenomic mRNA translation is not affected by elevated cytoplasmic sodium concentration, as occurs after alphavirus infection, whereas translation of host mRNAs is severely impaired under these conditions (5, 14, 15).

At least two sequences in SV subgenomic mRNA influence its translatability. In a recent article, we proposed that the 5' untranslated region of the SV subgenomic mRNA provides independence of eIF4G to recruit this mRNA to the translation machinery (6). Moreover, the first 275 nucleotides (nt) downstream from the translation initiation codon that encode part of the C protein act as a translation-enhancing element for SV 26S mRNA (9, 10). This sequence may fold in an extensively base-paired structure thought to favor the translatability of this mRNA only in infected cells (10). As a result, 26S mRNA has a low requirement for eIF2 α (39). The prevailing idea is, therefore, that the high translatability of 26S mRNA is derived from its structure. Infection of animal cells by a given virus provokes changes that favor viral mRNA translation but that would be detrimental for host protein synthesis. Contrary to this view, we now provide evidence that viral mRNAs transfected into SV-infected cells are poorly translated. The present findings suggest that SV translation is coupled to transcription of subgenomic mRNA.

MATERIALS AND METHODS

Cell line and viruses. BHK-21 cells and vesicular stomatitis virus (VSV), encephalomyocarditis virus (EMCV), or SV were used to perform the experiments. SV virus stock was prepared from a pT7 SVwt infective cDNA clone (where wt is wild type) (33). Viral infection of BHK cells was carried out in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) without serum for 40 min to permit virus attachment. Next, this medium was removed and infection continued in DMEM with 10% fetal calf serum.

Plasmids. Plasmids were used as DNA templates for in vitro RNA transcription with T7 or Sp6 RNA polymerases. The transcription mixture always contained an m⁷G(5')ppp(5')G cap analog except when mRNAs containing a picornavirus

* Corresponding author. Mailing address: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. Phone: 34-91-4978451. Fax: 34-91-4974799. E-mail: masanz@cbm.uam.es.

[∇] Published ahead of print on 18 April 2007.

internal ribosome entry site (IRES) were prepared. pT7 SVwt (33) was used as the parental plasmid for all of the constructs. The luciferase gene was derived from the plasmid pKS-Luc (38). pT7 rep C+Luc was obtained by the insertion of a double PCR product digested with AatII and ApaI in the same sites of pT7 SVwt. The double PCR product was made as follows. For the first PCRs, the primers 5'AatII and 3'joint C+luc (the sequences are shown below) were used, with pT7 SVwt as the DNA template, and primers 5'joint C+luc and 3'ApaI-luc were used, with pKS-Luc as the DNA template. A mixture of these products and the primers 5'AatII and 3'ApaI-luc were then used for the second PCR. pT7 Δ nsps rep C+Luc was derived from pT7 rep C+Luc, which has deleted the sequence between the SmaI and HpaI restriction sites. pT7 C+Luc was made by inserting the SacI/ApaI-digested PCR product obtained using the oligonucleotides 5'SacI-T7prom and 3'ApaI-luc and pT7 rep C+Luc as the DNA template in the same sites of pT7 SVwt. pT7 rep C has been described previously (34). pT7 rep -26S was made by inserting the PCR product obtained with the oligonucleotides 5'HpaI and 3'ApaI-nsP4 and pT7 SVwt as the DNA template digested with HpaI/ApaI in the same sites of pT7 SVwt. Plasmids pToto1101/Luc (4), pTM1-Luc (2), and pT7 5'NCpolioLuc (38) were used to obtain luciferase RNA preceded by the SV genomic leader sequence, the EMCV IRES sequence, and the poliovirus leader sequence, respectively. pT7 SV(P₇₂₆G) was obtained by insertion of a double PCR product digested with ClaI and SpeI in the same sites of pT7 SVwt. First, oligonucleotides 5'SV-ClaI and 3'nsP2 P₇₂₆G or 5'nsP2 P₇₂₆G and 3'SV-SpeI, respectively, were used as primers and pT7 SVwt as the DNA template. Next, a mixture of the products obtained with 5'SV-ClaI and 3'SV-SpeI as primers were used for the second PCR.

Oligonucleotides. The primer sequences are as follows: for 5'AatII, TTTGTCGACGTC AAGAAC; for 5'HpaI, TATGGCGTTAACCGTCTG; for 5'joint C-luc, CAGAAGAGTGGTCCGCACATATGGAAGACGCCAAAAAC; for 3'joint C-luc, GTTTTTGGCGTCTTCCATATGTGCGGACCCTCTTCTG; for 5'SacI-T7prom, GCGGGCGAGCTCTAATACGACTCACTATAGATAGTCACATAGT; for 3'ApaI-luc, ACGCGCGGGCCCTTACAATTTGGACTTCC; for 3'ApaI-nsP4, CAGGATTTATCCCGGGTCCATC; for 5'nsP2 P₇₂₆G, GCCTTAACGGAGGAGGCACC; for 3'nsP2 P₇₂₆G, GGTGCTCTCCGTTAAGGC; for 5'SV-ClaI, CATTGAATCGATATTACAG; and for 3'SV-SpeI, GTCCATACTAGTAATAGAG.

RNA transfection. Subconfluent BHK cells, uninfected or infected according to each experiment, were harvested, washed with ice-cold phosphate-buffered saline, and resuspended at a density of approximately 2.5×10^6 cells/ml in the same buffer. Then, 20 μ g of in vitro-transcribed RNA synthesized from the different constructs was added to 0.4 ml of cells and the mixture was transferred to a 2-mm cuvette. Extraction of mRNAs from culture cells was carried out by use of QIAGEN Oligotex Direct mRNA. Electroporation was performed at room temperature by generating two consecutive 1.5-kV, 25-mF pulses with a Genepulser apparatus (Bio-Rad), as previously described (21). Transfection efficiency measured by in situ immunofluorescence was always higher than 90% of cells.

Analysis of protein synthesis. BHK cells were seeded into 24-well Costar plates at a concentration of 10^5 cells/well. At the times indicated for each experiment, the media were removed and proteins were labeled for 30 min with 0.2 ml DMEM without methionine-cysteine supplemented with 2 μ l *trans*-labeled [³⁵S]Met-Cys (15 mCi/ml; Amersham) per well. The cells were then collected in the appropriate gel loading buffer and analyzed using 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The gels were subjected to fluorography by immersion in 1 M sodium salicylate and then dried and exposed to X-ray film.

Western blotting. Goat antiluciferase antibodies (ABcam) and mouse monoclonal antiactin antibodies (Chemicon International) were used. The former were used to determine the luciferase production of each sample and the latter as controls to determine the amount of a housekeeping cell protein. Also, rabbit polyclonal antibodies against anti-SV capsid protein were used.

Analysis of mRNA by real-time RT-PCR. Luciferase mRNA levels in transfected BHK cells were determined by real-time quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR) (6). For this purpose, total RNA was extracted from 2×10^5 cells at the times indicated in each figure by use of an RNeasy commercial kit (QIAGEN) following the manufacturer's recommendations. The isolated RNA was resuspended in 30 μ l of nuclease-free water, and 3 μ l was subjected to analysis. Real-time quantitative RT-PCR was performed with a LightCycler thermal cycler system (Roche Diagnostics) and an RNA Master SYBR green I kit (Roche Diagnostics) as described by the manufacturer. The primers nSP2-forward (5'-GGAGGGGCTCCAGGCGGACATCG-3'), corresponding to nt 1652 to 1674 in the SV sequence, and nSP2-reverse (5'-GCTCTCTCTGTA TTCTTGCG-3'), corresponding to nt 2034 to 2012 in the SV sequence, were used to quantify the genomic RNA present in the cells that were transfected with

the different Luc-containing replicons. The primers Luc-forward (5'-CCTTGA TTGACAAGGATGGATGGC-3'), corresponding to nt 1142 to 1165 in the open reading frame of luciferase, and Luc-reverse (5'-CATCGTCGGGAAGACCTGCCACGCCC-3'), corresponding to nt 1339 to 1314 in the open reading frame of luciferase, were employed to quantify the total RNA. Subgenomic RNA was calculated, in each case, as the difference between total RNA and genomic RNA. The amount of exogenous mRNA C+Luc present inside the electroporated cells was determined by employing the oligonucleotides against the luciferase sequence. These primers were designed to amplify sequences of 250 to 300 nt to maximize the efficiency of the reaction. RT-PCR was carried out in 20 μ l of LightCycler RNA Master SYBR green I solution containing 3 mM manganese acetate and a 1 μ M concentration of each primer. RT was performed at 61°C for 20 min. After that, PCR amplification was initiated with incubation at 95°C for 2 min, followed by 45 cycles of 95°C for 5 s, 58°C for 12 s, and 72°C for 20 s. Data analysis was done using Roche Molecular Biochemicals LightCycler software (version 3.3). The specificity of the amplification reactions was confirmed by analyzing the corresponding melting curves.

Dot blot analysis of mRNA. Biotinylated C+Luc RNA was obtained by in vitro transcription with the addition of biotin-21-UTP (0.5 mM) to the transcription mixture. For electroporation, 5×10^6 BHK cells infected with SV for 3 h with 100 PFU/cell or uninfected cells were used with 40 μ g of in vitro-synthesized RNA. The cells were then seeded in wells of an L-6 plate and harvested after 1 h. Total RNA was extracted from the cultures using an RNeasy kit (QIAGEN) and resuspended in 40 μ l RNase-free water. A Bio-Dot SF Microfiltration apparatus was used to fix 5 and 20 μ l of each sample on a nitrocellulose filter. The nitrocellulose filter was subsequently washed with 0.2 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.05% Triton X-100, and 3% bovine serum albumin and then vacuum dried at 80°C for 1 h. For detection, streptavidin-alkaline phosphatase was conjugated according to an enhanced chemiluminescence method (Amersham).

Measurement of luciferase activity. Cells were lysed in a buffer containing 0.5% Triton X-100, 25 mM glycylglycine (pH 7.8), and 1 mM dithiothreitol at different times postelectroporation. Luciferase activity was determined using a Monolith 2010 luminometer (Analytical Luminescence Laboratory), as described previously (38).

RESULTS

Low translatability of transfected subgenomic mRNA in SV-infected cells. The subgenomic 26S mRNA from SV is efficiently translated in infected cells during the late phase of infection, whereas cellular translation is inhibited. Our initial aim was to analyze the translational behavior of the SV subgenomic mRNA under infection or noninfection conditions. To achieve this goal, two different RNAs (Fig. 1A) were synthesized by in vitro transcription from the corresponding plasmids and electroporated into SV-infected or mock-infected BHK cells. One of the RNAs is an SV replicon (rep C+Luc), while the other RNA, representing the subgenomic mRNA C+Luc, is unable to replicate. After electroporation of rep C+Luc, initial translation generates the SV nsPs involved in RNA replication and transcription. The replicative complexes produce minus-strand RNA, which in turn serves as the template for synthesis of genomic (rep C+Luc) and subgenomic mRNA C+Luc by transcription from an internal promoter. Translation of this subgenomic mRNA gives rise to SV capsid (C) and luciferase (Luc) proteins. As expected, host translation was strongly inhibited at 3 h postelectroporation (hpe) of BHK cells with rep C+Luc and only translation of subgenomic mRNA was detected (Fig. 1B). The chimeric protein C+Luc was synthesized and rapidly processed by the autoproteolytic activity of C to release itself and Luc. A progressive increase in Luc activity was apparent over time, consistent with continuous luciferase production (data not shown). This result indicates that the subgenomic mRNA C+Luc generated in BHK cells transfected with the replicon is efficiently translated.

Translation of in vitro-synthesized mRNA C+Luc was then

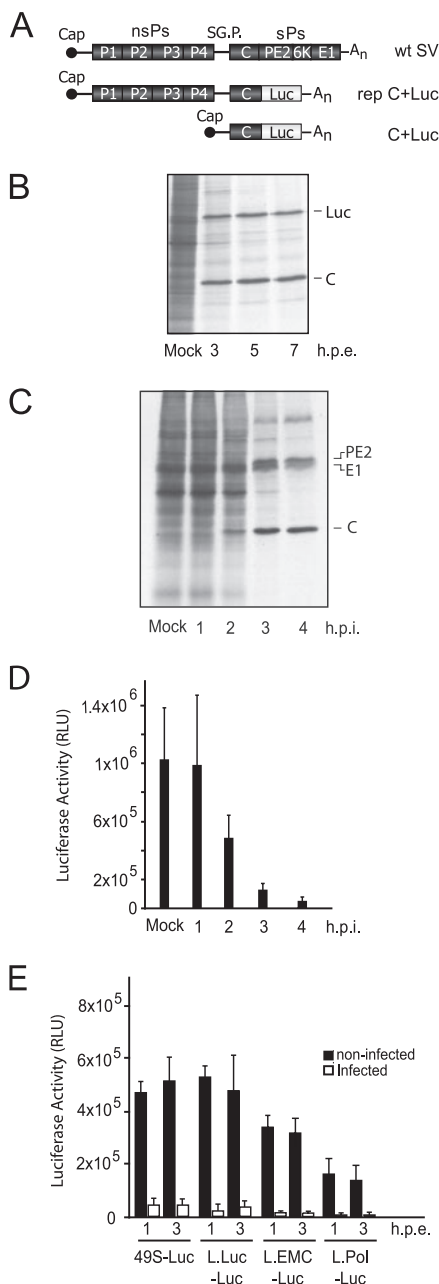


FIG. 1. Translation of SV subgenomic mRNA in infected BHK cells. (A) Schematic representation of the SV genome, the rep C+Luc replicon, and the subgenomic mRNA C+Luc. (B) About 10⁶ BHK cells were electroporated with 20 μg of rep C+Luc RNA, seeded in three wells of an L-24 plate, and labeled for 30 min with 15 μCi [³⁵S]Met-Cys at the times indicated. Next, SDS-PAGE was carried out, followed by fluorography and autoradiography. Mock cells were electroporated with 50 μl of transcription buffer. (C and D) Mock-infected and SV-infected BHK cells (100 PFU/cell) were electroporated with in vitro-synthesized mRNA C+Luc at different times after infection, as indicated in the text. (C) Half of the cells were seeded in L-24 wells for 1 h and then labeled for 30 min. (D) The remaining cells were recovered in 60 μl luciferase lysis buffer and 20 μl used to estimate Luc activity at 1 hpe, as described in Materials and Methods. (E) Translatability of different Luc-containing mRNAs. Different Luc-containing mRNAs made by in vitro transcription were electroporated into uninfected or SV-infected BHK cells (100 PFU/cell for 3 h). Luc activity was measured at the postelectroporation times indicated. Bars represent standard deviations from two independent experiments. RLU, relative luciferase units; SG.P., subgenomic promoter.

compared in SV-infected and uninfected BHK cells. To this end, this mRNA was electroporated into mock-infected or SV-infected BHK cells at different times postinfection and Luc activity was measured at 1 hpe (Fig. 1D). Protein synthesis was analyzed by radioactive labeling in parallel (Fig. 1C). SV proteins were detected from 2 hpe, indicating that viral translation continued after electroporation. Moreover, SV-induced shut-off of host protein synthesis was produced at 3 hpe. Notably, mRNA C+Luc was efficiently translated when it was transfected into uninfected BHK cells (Fig. 1D, “Mock” lane), while lower Luc activity was obtained after electroporation of SV-infected cells with that mRNA (Fig. 1D, lanes 3 and 4). The inhibition of mRNA C+Luc translation got progressively stronger over time in SV-infected cells.

To test whether the inhibition of mRNA C+Luc translation observed for SV-infected cells occurs with other types of mRNAs, protein synthesis directed by several mRNAs bearing different leader sequences followed by the Luc gene were analyzed. The different leader sequences tested were the SV genomic 49S mRNA, the genuine Luc leader sequence, the EMCV IRES, and the entire poliovirus 5' untranslated region. SV-infected cells were electroporated with the different mRNAs at 3 h postinfection (hpi). Translation of all of these mRNAs was inhibited by more than 80% in SV-infected cells at 1 and 3 hpe compared to levels with mock-infected BHK cells (Fig. 1E). These results suggest that mRNAs electroporated into SV-infected cells are poorly engaged in the translation machinery, whereas subgenomic mRNAs transcribed from a replicon are translated.

Several possibilities can be put forward to account for the lack of mRNA C+Luc translatability in SV-infected cells. One of them is that this mRNA is poorly transfected into those cells. To examine this possibility, the amount of mRNA transfected into both SV-infected and uninfected BHK cells was analyzed by several methods. First, biotinylated mRNA C+Luc was transfected into cells and the amount present was measured at 1 hpe by dot blot assay (Fig. 2A). It was noteworthy that, at 1 hpe, more mRNA was recovered from SV-infected cells than from uninfected cells. In addition, the amount of transfected mRNA was estimated by quantitative RT-PCR. In this case, uninfected or SV-infected cells were electroporated with in vitro-synthesized mRNA C+Luc and total mRNA was extracted at different hpe to quantitate the remaining amount of mRNA C+Luc. In agreement with the dot blot data (Fig. 2A), the amount of mRNA C+Luc recovered from infected cells was 1.4 times larger than that recovered from uninfected cells after electroporation of mRNA C+Luc (Fig. 2B). These findings support the notion that transfection of exogenous mRNAs is not hampered in SV-infected cells.

Another possible explanation for the low translatability of transfected mRNAs in SV-infected cells is that they are quickly degraded or inactivated. However, extensive mRNA degradation did not occur, since transfected mRNAs were equally stable in both mock and SV-infected cells, as determined by RT-PCR (Fig. 2B). To analyze whether the mRNAs electroporated into SV-infected cells were inactivated for translation, total mRNA from infected and uninfected cells electroporated with mRNA C+Luc was isolated at 2.5 hpe. This mRNA extracted from both types of electroporated cells was employed to further electroporate uninfected cells. The mRNA isolated

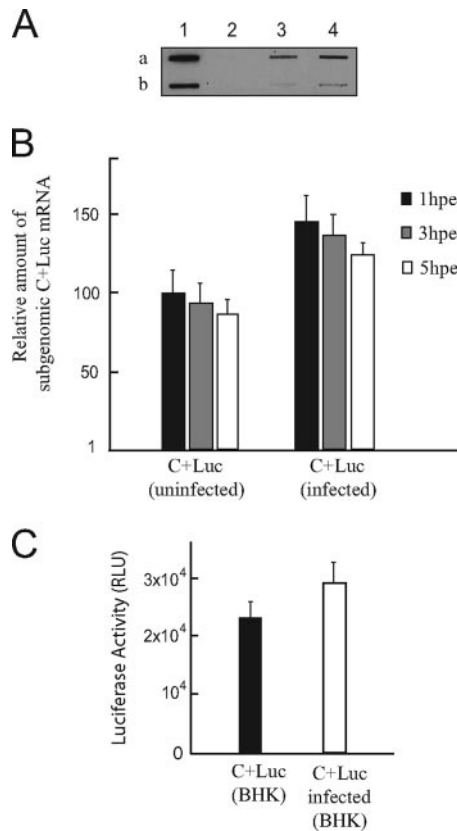


FIG. 2. Quantitation of subgenomic mRNA C+Luc in electroporated cells. (A) BHK cells (2×10^6) were electroporated with $40 \mu\text{g}$ of biotinylated, in vitro-synthesized mRNA C+Luc. Total RNA was recovered at 1 hpe in $50 \mu\text{l}$ H_2O and analyzed by dot blot assay with conjugated streptavidin-peroxidase. (Lane descriptions refer to rows a and b, respectively.) Lane 1 (control), 0.1 and $0.025 \mu\text{g}$ from biotinylated, in vitro-synthesized mRNA C+Luc; lane 2, 20 and $5 \mu\text{l}$ of RNA extracted from mock-infected BHK cells; lane 3, 20 and $5 \mu\text{l}$ of RNA extracted from BHK electroporated cells; lane 4, 20 and $5 \mu\text{l}$ of RNA extracted from SV-infected and electroporated cells. (B) In vitro-generated mRNA C+Luc ($20 \mu\text{g}$) was electroporated into uninfected or SV-infected BHK cells (100 PFU/cell for 3 h) and seeded in three wells of an L-24 plate, and at 1, 3, or 5 hpe total RNA was extracted from the cultures to be used as the template to quantify the amount of mRNA C+Luc by real-time RT-PCR. On the y axis, the relative amounts of C+Luc obtained are indicated, with 100 corresponding to the amount extracted at 1 hpe from uninfected cells. Bars represent standard deviations from two independent experiments. (C) Translatability of the mRNAs recovered from electroporated cells. mRNA C+Luc ($40 \mu\text{g}$) was electroporated into uninfected or SV-infected BHK cells (100 PFU/cell for 3 h). Two and one-half hours later, total mRNA was extracted from the cultures and used to electroporate uninfected cells. Luc activity was measured at 90 min after electroporation. Bars represent standard deviations from three independent measures from the same experiment. RLU, relative luciferase units.

from SV-infected cells produced 27% more Luc activity than mRNA extracted from uninfected cells at 90 min after transfection (Fig. 2C), in accordance with the larger amount of mRNA C+Luc detected by RT-PCR in infected cells. Therefore, the mRNA electroporated into SV-infected cells is neither degraded nor irreversibly inactivated for translation.

Alternatively, the nontranslatability of electroporated mRNAs in SV-infected cells could be due to differences between in

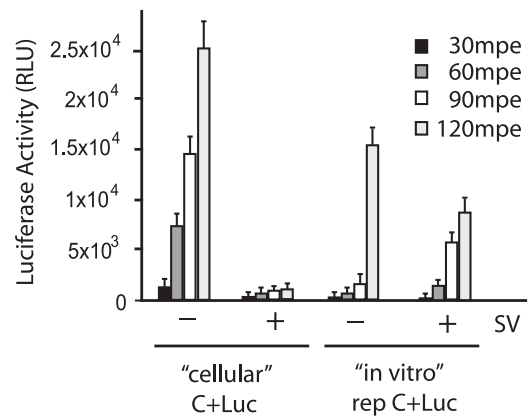


FIG. 3. Translatability of genuine mRNA C+Luc extracted from cells. BHK cells (2×10^6) were electroporated with $40 \mu\text{g}$ of rep C+Luc, and at 7 hpe total mRNA was extracted to be used for electroporation of uninfected or SV-infected cells (100 PFU/cell for 3 h). As a control, $20 \mu\text{g}$ of in vitro-synthesized rep C+Luc was also electroporated. At the times indicated (mpe, minutes postelectroporation), Luc activity was measured. Bars represent standard deviations from two independent experiments. RLU, relative luciferase units.

vitro-synthesized mRNAs and those produced in infected cells. For instance, it is possible that in vitro-synthesized mRNAs possess a cap structure different from that of mRNAs transcribed in the infected cells. To analyze this possibility, total mRNA from cells electroporated with the replicon rep C+Luc was extracted at 7 hpe. Translation of this genuine mRNA was analyzed by the detection of Luc activity after electroporation of uninfected or infected cells. The RNA electroporated includes, apart from cellular mRNA, viral subgenomic mRNA C+Luc and rep C+Luc. This rep C+Luc can replicate and give rise to mRNA C+Luc upon transcription. To avoid Luc activity from newly synthesized mRNA C+Luc, Luc activity was measured at early times after electroporation (Fig. 3). As occurred with in vitro-synthesized C+Luc, Luc activity from genuine mRNA extracted from cells was strongly inhibited in SV-infected cells. As a control, Luc activity in cells electroporated with in vitro-generated rep C+Luc was determined. Background levels of Luc activity were obtained in uninfected BHK cells electroporated only with rep C+Luc until 2 hpe, suggesting that this is the time necessary to generate subgenomic mRNAs. SV-infected cells transfected with rep C+Luc synthesize Luc earlier than uninfected cells but progress more slowly. In this case, the replicative complexes are already formed as a result of SV infection before rep C+Luc electroporation but this RNA should compete for minus- and plus-strand RNA synthesis with SV RNAs.

Transfected replicons are competent for replication in SV-infected cells. Taken together, the above data indicate that exogenous mRNAs are excluded from the protein-synthesizing machinery in SV-infected cells. However, replicons transfected into those cells could be used as templates for replication and transcription. This idea is reinforced by the use of ΔnsPs rep C+Luc (Fig. 4A), which lacks most of the coding sequence for SV nsPs. This SV-derived RNA requires the viral nsPs provided in *trans* by SV-infected cells for its replication and transcription. ΔnsPs rep C+Luc RNA was electroporated into mock- or SV-infected BHK cells and Luc activity measured at

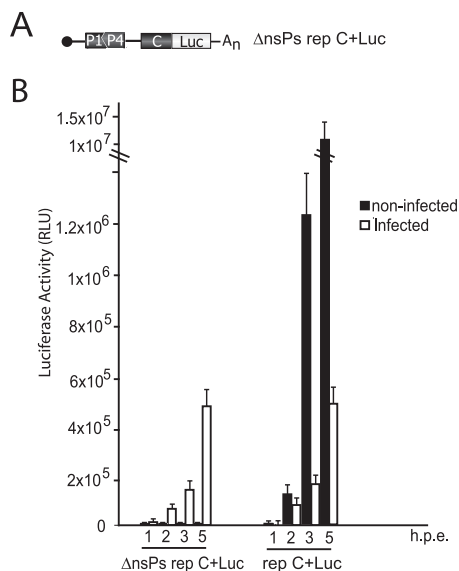


FIG. 4. Electroporated mRNA acts as a template for transcription. (A) Schematic representation of ΔnsPs rep C+Luc. (B) Δnsps rep C+Luc or rep C+Luc (20 μg) was electroporated into uninfected or SV-infected BHK cells (100 PFU/cell for 3 h). Luc activity was measured at the times indicated. Bars represent standard deviations from two independent experiments. RLU, relative luciferase units.

1, 2, 3, and 5 hpe (Fig. 4B). Obviously, Luc activity was not observed in uninfected cells, since they lack SV nsPs. However, increasing Luc activity was detected throughout the time course upon transfection of ΔnsPs rep C+Luc in SV-infected cells. These data indicate that the RNA transfected into SV-infected cells is not destroyed and can be used as a template for replication and transcription. Moreover, the subgenomic mRNA C+Luc synthesized can be translated in SV-infected cells if it is transcribed in these cells. As a control, rep C+Luc, which can replicate autonomously, was also electroporated. Notably, Luc activity obtained from this replicon in infected cells was similar to that obtained from ΔnsPs rep C+Luc (Fig. 4B). Probably, synthesis of nsPs was inhibited from rep C+Luc in SV-infected cells, as occurred with the other exogenous mRNAs. However, rep C+Luc can serve as a template for minus-strand and next for plus-strand RNA synthesis in SV-infected cells in the same way as ΔnsPs rep C+Luc. These results indicate that electroporated RNAs are not sequestered and localize in places in SV-infected cells where replication, transcription, and translation can take place.

Correlation with inhibition of host translation. The experiments described above indicated that the inhibition of translation for exogenous mRNAs and that for host mRNAs are correlated in SV-infected cells (Fig. 1C and D). An SV variant unable to block host protein synthesis has been described previously; this viable SV variant contains a point mutation in nsP2 and is able to replicate and produce viral proteins in BHK cells without interfering with cellular translation (11, 16). This SV variant was constructed by introducing a mutation, P₇₂₆G, in the sequence for nsP2 of our SV clone. BHK cells were electroporated with RNA from control SV or from this variant, and protein synthesis was analyzed at 7 hpe. As expected, this variant did not inhibit cellular protein synthesis, whereas the

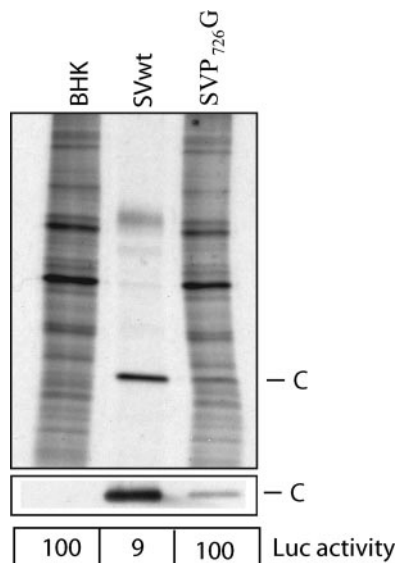


FIG. 5. Translatability of exogenous mRNA in BHK cells infected with an SV variant defective in the shutoff of host translation. About 2×10^6 BHK cells were electroporated with transcription buffer or with 40 μg of SV or SV(P₇₂₆G) in vitro-generated mRNAs. Half of the electroporated cells were labeled with [³⁵S]Met-Cys for 30 min at 7 hpe and analyzed by SDS-PAGE (top) or by Western blotting using anti-capsid antibodies (middle). The remaining cultures were electroporated with mRNA C+Luc, and Luc activity was measured at 90 min after electroporation. Relative values of Luc activity are shown (bottom), with 100 being the value obtained with BHK cells previously electroporated with transcription buffer.

capsid protein could be detected both by radioactive labeling and by Western blotting (Fig. 5). Cells were then electroporated a second time with in vitro-synthesized mRNA C+Luc, and Luc activity was measured 90 min later. In agreement with the experiments described above, Luc activity was inhibited by more than 90% in cells electroporated with SV RNA compared to levels for uninfected BHK cells, whereas no inhibition was detected for the SV(P₇₂₆G) variant. Therefore, the blockade of cellular protein synthesis is associated with the inhibition of translation of exogenous mRNAs in SV-infected cells.

Lack of competition between viral transcripts and transfected mRNAs. Our next aim was to determine whether viral mRNAs derived from transcription and the exogenous mRNAs compete for the translation machinery. Two replicons were employed for this experiment: rep C, which produces large amounts of C protein, and a replicon with a deletion of the subgenomic promoter after the stop codon for the nsP4 protein (rep -26S) (Fig. 6A). This second replicon does not synthesize any sPs. Both replicons were equally efficient at shutting off cellular protein synthesis (Fig. 6B). BHK cells were electroporated with equivalent amounts of rep C, rep -26S, or transcription buffer as a control, and a second electroporation with mRNA C+Luc was carried out 4 h later. Luc activity and protein synthesis were measured 1 or 3 h after the second electroporation. Large amounts of C protein were indeed synthesized from rep C, whereas no viral proteins were detected from rep -26S (Fig. 6B). Notably, Luc activity in both types of replicon-expressing cells was strongly inhibited (~90%) compared with activity in control cells (Fig. 6C). These findings

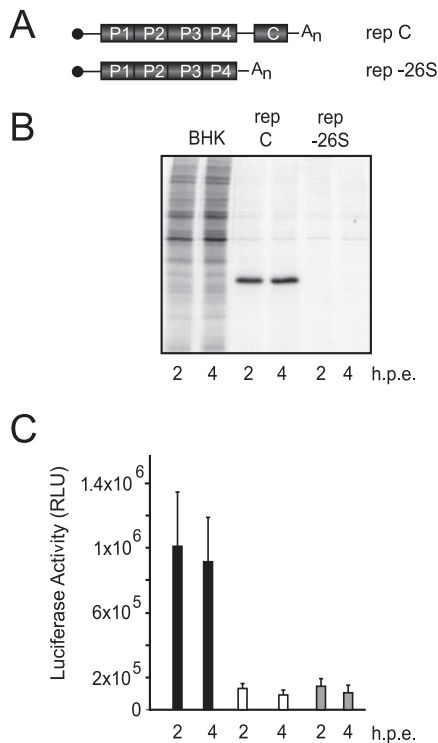


FIG. 6. Competition between endogenous viral transcripts and transfected mRNAs. (A) Schematic representation of the different replicons. (B and C) BHK cells (2×10^6) were electroporated with transcription buffer or with 40 μg of in vitro-synthesized replicons. Four hours later, a second electroporation was carried out with 40 μg of in vitro-synthesized mRNA C+Luc. (B) Half of the cells were labeled with [^{35}S]Met-Cys for 30 min 2 or 4 h after the second electroporation and analyzed by SDS-PAGE. (C) The remaining cells were used to measure Luc activity. Bars represent standard deviations from two independent experiments. RLU, relative luciferase units.

indicate that viral transcription from the subgenomic promoter is not necessary to block the translation of exogenous mRNAs. Therefore, inhibition of the translation of transfected mRNAs in SV-infected cells does not seem to be a consequence of competition with the subgenomic mRNAs produced by the viral replication machinery.

To determine the translational efficiencies of subgenomic mRNA C+Luc in the different situations assayed above, BHK cells were electroporated with mRNA C+Luc or rep C+Luc and SV-infected cells with mRNA C+Luc, and the amount of Luc RNA was quantified by real-time RT-PCR and compared with the Luc activity obtained in each case. Remarkably, the highest translational efficiency corresponded to exogenous

mRNA C+Luc electroporated into uninfected cells (Table 1). Although greater Luc activity was obtained from rep C+Luc-electroporated cells, the ratio of luciferase activity to the amount of each mRNA was lower than the ratio for translation of exogenous mRNA C+Luc in uninfected cells. mRNA C+Luc transfected into infected cells clearly exhibited the lowest translation ratio (about 60 times lower than in uninfected BHK cells).

Translation of several mRNAs transfected into BHK cells infected with different animal viruses. Finally, the impairment of translation of transfected mRNAs was investigated in BHK cells infected with different animal viruses. For this experiment, different mRNAs (mRNA C+Luc, L.luc-Luc, and L.EMC-Luc) were electroporated into uninfected or BHK cells infected with VSV, EMCV, or SV. Protein synthesis was determined at 4 hpi. The cells were then electroporated, and Luc activity was examined at 1 and 3 hpe (Fig. 7A and B). Compared with results for uninfected cells, an extensive blockade of Luc synthesis was observed for cells infected with the three different RNA viruses assayed. Notably, mRNA L.EMC-Luc was strongly inhibited in EMCV-infected cells, despite the fact that this mRNA contains the EMCV IRES. In conclusion, these data suggest that the suppression of exogenous viral mRNA translation occurs in cells infected with other RNA viruses, such as VSV and EMCV, which belong to families other than *Togaviridae*.

DISCUSSION

SV-infected cells provide a paradigmatic model to analyze the regulation of translation in mammalian cells. At 3 to 4 hpi, these cells efficiently translate subgenomic viral mRNA, whereas cellular protein synthesis is abrogated. This could be explained by the induction of cellular modifications after viral infection, such that the viral 26S mRNA can be translated preferentially because viral mRNAs have evolved structures that optimize their translatability under these conditions. Particular structures present in viral mRNAs often promote interaction with the protein-synthesizing machinery, and so these mRNAs have a low requirement for some initiation factors (12, 18, 19). Hence, some of the initiation factors are inactivated in a number of viral infections (22, 26). For the subgenomic mRNA from alphaviruses, a low requirement for eIF4E (the cap binding protein), eIF4B (37), eIF4G (6), and eIF2 α (17, 39) has been reported. In fact, eIF2 α becomes phosphorylated in SV-infected cells.

According to our present findings, transfected subgenomic SV mRNA is poorly translated in infected cells. Therefore, this mRNA must meet two criteria in order to direct protein syn-

TABLE 1. Translatability in mock-infected or SV-infected BHK cells^a

RNA/BHK cells	Relative amt of mRNA (% [SD])	Luc activity (arbitrary units [SD])	Ratio of Luc activity/mRNA
C+Luc/mock infected	1.0 (± 11)	74,124 ($\pm 16\%$)	74,124
C+Luc/SV infected ^b	1.7 (± 12)	2,245 ($\pm 10\%$)	1,290
rep C+Luc/mock infected	114.1 (± 6)	4.4×10^6 ($\pm 13\%$)	39,454

^a BHK cells were electroporated with C+Luc or rep C+Luc RNA and SV-infected cells with C+Luc RNA. Luciferase activity and Luc RNA were measured and extracted at 1 hpe in C+Luc-electroporated cells. The same procedure was followed at 4 hpe for rep C+Luc-electroporated cells.

^b SV-infected cells were used at 3 hpi.

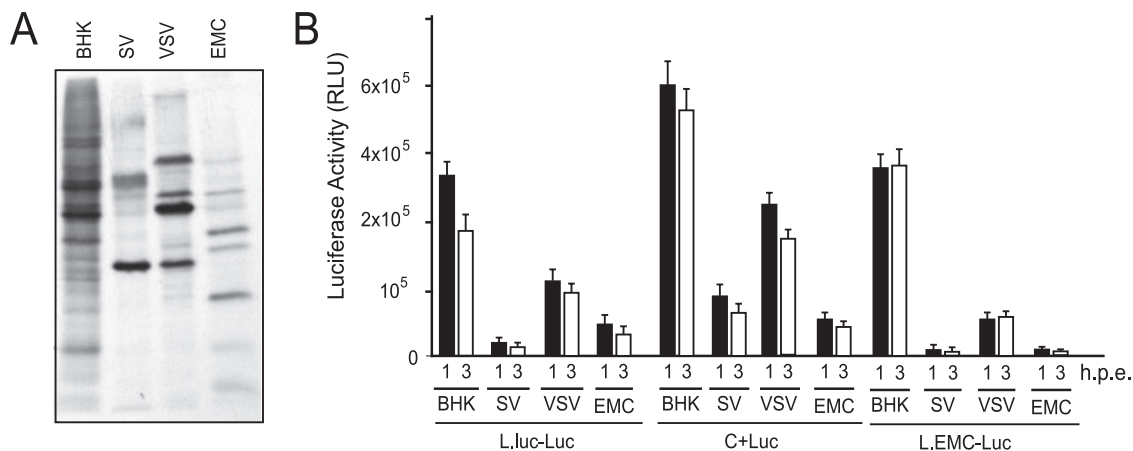


FIG. 7. Transfection of several Luc mRNAs in BHK cells infected with different viruses. Cells (2×10^6) mock infected or infected with SV (50 PFU/cell), VSV (40 PFU/cell), or EMCV (20 PFU/cell) for 4 h were electroporated with 40 μ g of the indicated in vitro-synthesized mRNAs. (A) Half of the cells were labeled with [³⁵S]Met-Cys at 4 hpi and the proteins analyzed by SDS-PAGE. (B) The remaining cultures were electroporated and luciferase activity measured at 1 and 3 hpe. Bars represent standard deviations from two independent experiments. RLU, relative luciferase units.

thesis. First, it must have particular sequences that confer translation efficiency (9, 10, 35; our unpublished results). Second, this mRNA should be synthesized by the viral transcription machinery. The first 275 nt of the C sequence in the SV subgenomic mRNA form a tertiary structure that acts as a translation-enhancing element in infected cells (9, 10). However, the presence of special motifs or structures in the subgenomic SV mRNA does not in itself guarantee translatability when a cell is infected.

The finding that SV translation is coupled to viral transcription provides new insight into the inhibition of translation in the infected cells. Previous studies indicated that SV subgenomic mRNA had a sequence that enhanced translation in infected cells but exhibited the opposite effect in uninfected ones (9, 10, 35), suggesting that the cellular modifications arising from viral infection enhanced its translation. In contrast, our results indicate that the SV subgenomic mRNA is translated efficiently in uninfected cells. The results reported by Frolov and Schlesinger (10) on the translation-enhancing element present in SV subgenomic mRNA suggested that this element was detrimental in uninfected cells. However, these authors assayed only chimeric mRNAs encoding the truncated but not the entire C sequence with *lacZ*. They also employed an expression system that synthesized mRNAs in the nuclei of uninfected cells. A similar work with Semliki Forest virus concluded that the subgenomic mRNA had a translation-enhancing region that was functional only in virus-infected cells (35). In that study, all recombinant subgenomic mRNAs tested, including the entire C sequence fused to *lacZ*, were able to promote comparable levels of protein synthesis. Our present findings indicate that the SV subgenomic mRNA is translated at least twice as efficiently in uninfected BHK cells as in cells transfected with the corresponding replicon. Moreover, the transfected subgenomic mRNA is translated about 60 times more effectively in uninfected BHK cells than in SV-infected cells. This feature cannot be attributed to deficient electroporation of the infected cells because the amount of exogenous RNA present in these cells was larger than that present in

uninfected cells. A general inhibition of translation due to the electroporation process did not occur, since active viral protein synthesis was evidenced by radioactive labeling. The exclusion of transfected mRNAs cannot be ascribed to competition by the viral mRNAs produced in the infected cells. This was illustrated by the fact that an SV replicon that does not synthesize subgenomic mRNA still impairs translation of transfected viral mRNA. Although the subgenomic mRNA has a lower translatability in an infected environment, its particular structure together with the large amounts present in infected cells produced the viral sPs in abundance sufficient to form new virus particles.

The finding that an SV variant defective to abolish host translation is also unable to inhibit translation of electroporated mRNAs suggests that similar mechanisms can operate in both circumstances. Perhaps viral replication recruits some components of the translation machinery to couple them to translation. The P₇₂₆G variant has a lower replicative capacity, which might imply less capacity to recruit translation components. Alternatively, the mutated nsP2 could be involved in the interaction with a putative translation component. Further studies to localize electroporated mRNAs and the translation components in infected cells could shed more light on the translation inhibition mechanism.

Other functions in animal viruses are certainly coupled. This is the case for picornaviruses (13) or ambisense viruses (28), where viral transcription necessitates continuous viral protein synthesis. In addition, coupling between synthesis of viral genomes and encapsidation has been described to occur during the morphogenesis of poliovirus (29), flavivirus (20), and bromovirus (3). Cytoplasmic replication of animal viruses could rely on coupling between transcription and translation, as occurs with bacterial mRNAs (24). Findings reported for SV may also be applicable to cells infected with other animal viruses, since IRES-containing mRNAs are also excluded from translation in cells infected with a picornavirus (EMCV) or a rhabdovirus (VSV). During the preparation of the manuscript, two studies describing how preferential translation of different viral

mRNAs was dependent on viral transcription were published (25, 40). In one of these studies, it was found that coupling between translation and transcription of RNA2 may occur in cells infected with red clover necrotic mosaic virus (25). In this case, the uncapped viral mRNA is not translated in uninfected cells and directs protein synthesis only when RNA replication occurs. In the other study, it was discovered that preferential translation of VSV mRNAs is also conferred by transcription from the viral genome (40). At present, little about the molecular mechanism responsible for coupling between viral translation and transcription is known. Montgomery et al. reported that the nsp2 proteins from different alphaviruses interact with ribosomal protein S6 (27). According to the authors, the nsp2 protein, besides participating in replication, may also alter the ribosome contributing to the differential translation of host and viral mRNAs. Future work will determine whether coupling between translation and transcription is a common feature in different families of viruses and what molecular mechanisms are implicated in this coupling.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant (BFU2006-02182/BMC) from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica and an institutional grant awarded to the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa by the Fundación Ramón Areces. A.C. is the recipient of an FPI fellowship.

REFERENCES

- Agapov, E. V., I. Frolov, B. D. Lindenbach, B. M. Pragai, S. Schlesinger, and C. M. Rice. 1998. Noncytopathic Sindbis virus RNA vectors for heterologous gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:12989–12994.
- Alvarez, E., L. Menendez-Arias, and L. Carrasco. 2003. The eukaryotic translation initiation factor 4G1 is cleaved by different retroviral proteases. *J. Virol.* **77**:12392–12400.
- Annamalai, P., and A. L. Rao. 2006. Packaging of brome mosaic virus subgenomic RNA is functionally coupled to replication-dependent transcription and translation of coat protein. *J. Virol.* **80**:10096–10108.
- Bick, M. J., J.-W. N. Carroll, G. Gao, S. P. Goff, C. M. Rice, and M. R. MacDonald. 2003. Expression of the zinc-finger antiviral protein inhibits alphavirus replication. *J. Virol.* **77**:11555–11562.
- Carrasco, L. 1977. The inhibition of cell functions after viral infection. A proposed general mechanism. *FEBS Lett.* **76**:11–15.
- Castello, A., M. A. Sanz, S. Molina, and L. Carrasco. 2006. Translation of Sindbis virus 26S mRNA does not require intact eukaryotic initiation factor 4G. *J. Mol. Biol.* **355**:942–956.
- Frolov, I., E. Agapov, T. A. Hoffman, Jr., B. M. Pragai, M. Lipka, S. Schlesinger, and C. M. Rice. 1999. Selection of RNA replicons capable of persistent noncytopathic replication in mammalian cells. *J. Virol.* **73**:3854–3865.
- Frolov, I., and S. Schlesinger. 1994. Comparison of the effects of Sindbis virus and Sindbis virus replicons on host cell protein synthesis and cytopathogenicity in BHK cells. *J. Virol.* **68**:1721–1727.
- Frolov, I., and S. Schlesinger. 1996. Translation of Sindbis virus mRNA: analysis of sequences downstream of the initiating AUG codon that enhance translation. *J. Virol.* **70**:1182–1190.
- Frolov, I., and S. Schlesinger. 1994. Translation of Sindbis virus mRNA: effects of sequences downstream of the initiating codon. *J. Virol.* **68**:8111–8117.
- Frolova, E. I., R. Z. Fayzulina, S. H. Cook, D. E. Griffin, C. M. Rice, and I. Frolov. 2002. Roles of nonstructural protein nsP2 and alpha/beta interferons in determining the outcome of Sindbis virus infection. *J. Virol.* **76**:11254–11264.
- Gale, M., Jr., S. L. Tan, and M. G. Katze. 2000. Translational control of viral gene expression in eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:239–280.
- Gamarnik, A. V., and R. Andino. 1998. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev.* **12**:2293–2304.
- Garry, R. F. 1994. Sindbis virus-induced inhibition of protein synthesis is partially reversed by medium containing an elevated potassium concentration. *J. Gen. Virol.* **75**:411–415.
- Garry, R. F., J. M. Bishop, S. Parker, K. Westbrook, G. Lewis, and M. R. Waite. 1979. Na⁺ and K⁺ concentrations and the regulation of protein synthesis in Sindbis virus-infected chick cells. *Virology* **96**:108–120.
- Gorchakov, R., E. Frolova, and I. Frolov. 2005. Inhibition of transcription and translation in Sindbis virus-infected cells. *J. Virol.* **79**:9397–9409.
- Gorchakov, R., E. Frolova, B. R. Williams, C. M. Rice, and I. Frolov. 2004. PKR-dependent and -independent mechanisms are involved in translational shutoff during Sindbis virus infection. *J. Virol.* **78**:8455–8467.
- Hellen, C. U., and T. V. Pestova. 1999. Translation of hepatitis C virus RNA. *J. Viral Hepat.* **6**:79–87.
- Jang, S. K. 2006. Internal initiation: IRES elements of picornaviruses and hepatitis C virus. *Virus Res.* **119**:2–15.
- Khromykh, A. A., A. N. Varnavski, P. L. Sedlak, and E. G. Westaway. 2001. Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus. *J. Virol.* **75**:4633–4640.
- Liljestrom, P., S. Lusa, D. Huylebroeck, and H. Garoff. 1991. In vitro mutagenesis of a full-length cDNA clone of Semliki Forest virus: the small 6,000-molecular-weight membrane protein modulates virus release. *J. Virol.* **65**:4107–4113.
- Lloyd, R. E. 2006. Translational control by viral proteinases. *Virus Res.* **119**:76–88.
- McInerney, G. M., N. L. Kedersha, R. J. Kaufman, P. Anderson, and P. Liljestrom. 2005. Importance of eIF2alpha phosphorylation and stress granule assembly in alphavirus translation regulation. *Mol. Biol. Cell* **16**:3753–3763.
- Miller, O. L., Jr., B. A. Hamkalo, and C. A. Thomas, Jr. 1970. Visualization of bacterial genes in action. *Science* **169**:392–395.
- Mizumoto, H., H. O. Iwakawa, M. Kaido, K. Mise, and T. Okuno. 2006. Cap-independent translation mechanism of red clover necrotic mosaic virus RNA2 differs from that of RNA1 and is linked to RNA replication. *J. Virol.* **80**:3781–3791.
- Mohr, I. 2006. Phosphorylation and dephosphorylation events that regulate viral mRNA translation. *Virus Res.* **119**:89–99.
- Montgomery, S. A., P. Berglund, C. W. Beard, and R. E. Johnston. 2006. Ribosomal protein S6 associates with alphavirus nonstructural protein 2 and mediates expression from alphavirus messages. *J. Virol.* **80**:7729–7739.
- Nguyen, M., and A. L. Haenni. 2003. Expression strategies of ambisense viruses. *Virus Res.* **93**:141–150.
- Nugent, C. L., K. L. Johnson, P. Sarnow, and K. Kirkegaard. 1999. Functional coupling between replication and packaging of poliovirus replicon RNA. *J. Virol.* **73**:427–435.
- Perri, S., D. A. Driver, J. P. Gardner, S. Sherrill, B. A. Belli, T. W. Dubensky, Jr., and J. M. Polo. 2000. Replicon vectors derived from Sindbis virus and Semliki Forest virus that establish persistent replication in host cells. *J. Virol.* **74**:9802–9807.
- Petrakova, O., E. Volkova, R. Gorchakov, S. Paessler, R. M. Kinney, and I. Frolov. 2005. Noncytopathic replication of Venezuelan equine encephalitis virus and eastern equine encephalitis virus replicons in mammalian cells. *J. Virol.* **79**:7597–7608.
- Ryman, K. D., K. C. Meier, E. M. Nangle, S. L. Ragsdale, N. L. Korneeva, R. E. Rhoads, M. R. MacDonald, and W. B. Klimstra. 2005. Sindbis virus translation is inhibited by a PKR/RNase L-independent effector induced by alpha/beta interferon priming of dendritic cells. *J. Virol.* **79**:1487–1499.
- Sanz, M. A., and L. Carrasco. 2001. Sindbis virus variant with a deletion in the 6K gene shows defects in glycoprotein processing and trafficking: lack of complementation by a wild-type 6K gene in *trans*. *J. Virol.* **75**:7778–7784.
- Sanz, M. A., V. Madan, L. Carrasco, and J. L. Nieva. 2003. Interfacial domains in Sindbis virus 6K protein. Detection and functional characterization. *J. Biol. Chem.* **278**:2051–2057.
- Sjoberg, E. M., and H. Garoff. 1996. The translation-enhancing region of the Semliki Forest virus subgenome is only functional in the virus-infected cell. *J. Gen. Virol.* **77**:1323–1327.
- Strauss, J. H., and E. G. Strauss. 1994. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.* **58**:491–562.
- van Steeg, H., M. van Grinsven, F. van Mansfeld, H. O. Voorma, and R. Benne. 1981. Initiation of protein synthesis in neuroblastoma cells infected by Semliki Forest virus. A decreased requirement of late viral mRNA for eIF-4B and cap binding protein. *FEBS Lett.* **129**:62–66.
- Ventoso, I., and L. Carrasco. 1995. A poliovirus 2A^{Pro} mutant unable to cleave 3CD shows inefficient viral protein synthesis and transactivation defects. *J. Virol.* **69**:6280–6288.
- Ventoso, I., M. A. Sanz, S. Molina, J. J. Berlanga, L. Carrasco, and M. Esteban. 2006. Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2alpha phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR. *Genes Dev.* **20**:87–100.
- Whitlow, Z. W., J. H. Connor, and D. S. Lyles. 2006. Preferential translation of vesicular stomatitis virus mRNAs is conferred by transcription from the viral genome. *J. Virol.* **80**:11733–11742.

Viroporins from RNA viruses induce caspase-dependent apoptosis

Vanessa Madan, Alfredo Castelló and Luis Carrasco*

Centro de Biología Molecular (CSIC-UAM), Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain.

Summary

The virus-encoded viroporins are known to modify membrane permeability and play an essential role in virus budding. Here, a comparative analysis of the membrane permeabilization capacity of a number of viroporins was performed in baby hamster kidney cells. Synthesis of 6K protein from Sindbis virus, E from mouse hepatitis virus, M2 from influenza A virus, and 2B and 3A from poliovirus enhanced membrane permeability to different extents. We show that two proteins from hepatitis C virus, p7 and NS4A, also display viroporin activity to a level comparable to 6K protein. In addition to their capacity to disrupt ionic cellular homeostasis and promote bacterial cell lysis, the expressed viroporins were able to induce cell death. Degradation of internucleosomal DNA and generation of apoptotic bodies were observed upon viroporin expression. Consistently, cleavage of translation initiation factor 4G1 and poly-(ADP-ribose) polymerase indicated activation of effector caspase-3. We found that poliovirus 2B localizes partially in mitochondria and induces an anomalous perinuclear distribution of these organelles. Mitochondria morphology was also altered after expression of other viroporins. Finally, detection of cytochrome *c* release from mitochondria suggests involvement of the mitochondrial pathway in viroporin-induced apoptosis. These findings suggest that viroporins induce caspase-dependent programmed cell death.

Introduction

Alterations in cellular ion homeostasis are a common hallmark during infection of mammalian cells by animal viruses (Carrasco, 1995). The vast majority of RNA animal viruses encode cytotoxic pore-forming proteins known as

viroporins, which modify membrane function at late stages of infection and facilitate budding of virions from infected cells. Viroporins are small, non-glycosylated, highly hydrophobic viral polypeptides which interact with cell membranes and increase their permeability to ions and other low-molecular-weight compounds (Carrasco, 1995; Gonzalez and Carrasco, 2003). They are usually integral proteins that possess at least one amphipathic α -helix and, in some instances, a second hydrophobic domain. Upon membrane insertion, viroporins tend to oligomerize to assemble hydrophilic pores (Pinto *et al.*, 1992; Grice *et al.*, 1997; Agirre *et al.*, 2002; Melton *et al.*, 2002; Pavlovic *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2004). Some viroporins are not required for production of viral progeny, although their expression significantly increases the formation of new virus particles (Klimkait *et al.*, 1990; Watanabe *et al.*, 2001; Kuo and Masters, 2003; DeDiego *et al.*, 2007). However, these proteins are present in low amounts both in virions and at the plasma membrane (Klimkait *et al.*, 1990; Yu *et al.*, 1994; Loewy *et al.*, 1995).

The 6K protein from Sindbis virus (SV; family *Togaviridae*), M2 from influenza A virus (IAV; family *Orthomyxoviridae*), and 2B and 3A from poliovirus (PV; family *Picornaviridae*) represent examples of well-known viroporins (Gonzalez and Carrasco, 2003). SV 6K, a palmitoylated protein of 55 amino acids, contains a conserved sequence motif, rich in aromatic residues, consisting of two interfacial domains at the N-terminal region, which has been described to be important both for virus budding and to enhance membrane permeability (Sanz *et al.*, 2003). IAV M2 (96 amino acids), one of the best characterized viroporins, forms a proton channel acting both during viral entry and virion budding (Ruigrok *et al.*, 1991; Mould *et al.*, 2000). PV 2B protein is associated with the viral replication complex and virus-induced membranes (Bienz *et al.*, 1992; Schlegel *et al.*, 1996), and localizes to the ER and Golgi complex when expressed individually (Sandoval and Carrasco, 1997). Furthermore, the coxsackievirus (CV) 2B protein has been directly implicated in the disruption of Ca^{2+} homeostasis during infection (van Kuppeveld *et al.*, 1997). PV 3A exhibits significant effects on membrane rearrangement, inhibits glycoprotein trafficking, and participates in initiation of viral RNA synthesis (Suhy *et al.*, 2000; Choe *et al.*, 2005). Recently, we described the viroporin activity of E protein from mouse hepatitis virus (MHV-A59; family *Coronaviridae*) both in

Received 23 July, 2007; revised 27 August, 2007; accepted 10 September, 2007. *For correspondence. E-mail lcarrasco@cbm.uam.es; Tel. (+34) 91 497 84 50; Fax (+34) 91 497 49 77.

bacteria and in mammalian cells (Madan *et al.*, 2005a). Moreover, MHV variants with mutations in the E gene present aberrant morphology of virus particles as also occurs when SV 6K gene is mutated (Fischer *et al.*, 1998). These results provide evidence for a role of some viroporins in virion morphogenesis. The viroporin group also contains viral proteins, such as HIV-1 Vpu, human respiratory syncytial virus SH, avian reovirus p10, Japanese encephalitis virus NS2B or SARS-CoV E protein among others (Chang *et al.*, 1999; Lombardo *et al.*, 2000; Gonzalez and Carrasco, 2003; Liao *et al.*, 2006). Additionally, a number of viral glycoproteins (e.g. NS3 of blue-tongue virus or gp41 of HIV-1) have also been described to possess viroporin-like activity (Arroyo *et al.*, 1995; Han and Harty, 2004).

Much research effort continues to be directed towards discovery of new viroporins and analysis of their function during infection. We found that both p7 and NS4A proteins from hepatitis C virus (HCV; family *Flaviviridae*) share typical features with the viroporin group. p7 is a small hydrophobic protein of 63 amino acids that is not required for RNA replication (Carrere-Kremer *et al.*, 2002) and forms oligomeric cation channels both in planar lipid bilayers and in cells (Griffin *et al.*, 2003; Pavlovic *et al.*, 2003; Clarke *et al.*, 2006). On the other hand, HCV NS4A is a small non-structural protein known to act as an essential cofactor for serine protease activity of HCV NS3 and is therefore required for the proteolytic processing of the viral polyprotein (Failla *et al.*, 1994). NS4A localizes to ER membranes and is responsible for directing the NS3 protease to these membranes (Wolk *et al.*, 2000).

An increasing number of animal viruses are known to induce a defensive apoptotic response in host cells at late stages of infection (O'Brien, 1998). Several picornaviruses, including PV and CV, are able to kill cells by apoptosis in a variety of situations (Tolskaya *et al.*, 1995; Agol *et al.*, 1998; Carthy *et al.*, 1998). Many other enveloped RNA viruses, such as alphaviruses, coronaviruses, influenza viruses or HCV, also induce caspase-3-mediated apoptosis (Grandgirard *et al.*, 1998; An *et al.*, 1999; Kalkeri *et al.*, 2001; Wurzer *et al.*, 2003). Programmed cell death or apoptosis is involved in the organized elimination of cells during tissue development and somatic cell turnover, as well as during cell senescence and organism ageing (Kerr *et al.*, 1972; Thompson, 1995). Several pathways can lead to execution of apoptosis by activating a family of proteases known as caspases (Cohen, 1997). The extrinsic or death-receptor pathway requires binding of ligands such as CD95 to transmembrane death receptors, followed by activation of caspase-8 (Ashkenazi and Dixit, 1998). The intrinsic or mitochondrial pathway, triggered by mitochondrial membrane depolarization, involves disruption of the mitochondrial membrane and subsequent release from the intermembrane space of

cytochrome *c*, which participates in formation of the apoptosome together with apoptosis protease-activating factor-1 and pro-caspase 9 (Zamzami and Kroemer, 2001). In addition, an ER-specific apoptotic pathway is activated by perturbation of ER Ca(2+) homeostasis or under ER stress conditions, involving activation of caspase-12 and caspase-9 (Morishima *et al.*, 2002). Although the upstream steps of these pathways are different, they converge with the activation of the effector caspase-3, followed by extensive degradation of nuclear DNA and fragmentation of the nucleus of apoptotic cells.

In the present work, we analysed the permeabilization kinetics of SV 6K, MHV-A59 E, IAV M2, PV 2B and PV 3A viroporins after expression in culture cells. Our findings reveal that both p7 and NS4A proteins from HCV have the capacity to permeabilize baby hamster kidney (BHK) cells. We also provide evidence that viroporins can induce an apoptotic response in these cells. Finally, we show that in addition to its localization to the ER and Golgi compartments, PV 2B is also associated with mitochondria and alters the normal morphology of these organelles, as occurs with HCV p7 and NS4A. Together, these data suggest a previously unrecognized role of viroporins in cytotoxicity and indicate that these proteins are able to induce apoptosis upon viral infection.

Results

Permeabilization of BHK cells by viroporins from different RNA animal viruses

A comparative analysis was performed of the capacity of different viroporins to permeabilize the plasma membrane of BHK cells. To this end, the following known viroporins were selected: 6K from SV, E protein from MHV-A59, M2 from IAV, and 2B and 3A from PV. In addition, two small proteins from HCV, p7 and NS4A, were included in the study. These two proteins were selected as potential members of the viroporin group after examining their sequences, structural features, and their Kyte-Doolittle hydrophobicity profiles (data not shown). To analyse membrane permeabilization to the translation inhibitor hygromycin B (HB), an expression system was developed based on a SV replicon. Seven replicons were obtained by cloning the viroporin sequence after the SV capsid (C) gene (Fig. 1). Upon translation of the subgenomic mRNA, the C protein is detached by its autoproteolytic activity and the remaining protein is synthesized at levels comparable to those obtained with late proteins in SV-infected cells (Madan *et al.*, 2005b). This system is suitable to examine the permeabilizing capacity of each protein at different times after transfection. *In vitro*-transcribed RNAs from the different pT7SVrep C + Viroporin plasmids were electroporated in BHK cells and, at 5, 8 and 16 h post elec-

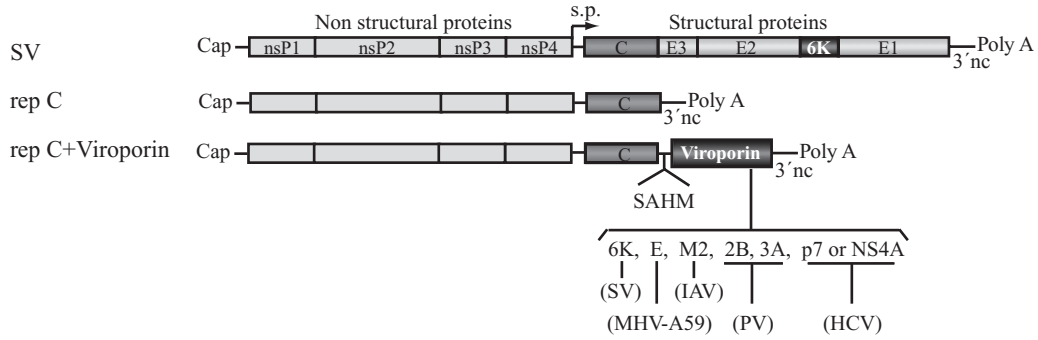


Fig. 1. Schematic representation of the SV genome and SV-derived replicons (RNA) with or without additional viroporin sequences. s.p., subgenomic promoter.

trophation (hpe), protein synthesis was estimated in the absence or presence of HB (Fig. 2). C protein and viroporin synthesis were already detected by radiolabelling with [³⁵S]Met/Cys at 5 hpe (data not shown). Figure 2A shows a representative PAGE analysis at 8 hpe, in which

viroporin bands are clearly present and migrate according to their expected molecular weight. To detect NS4A expression at 8 hpe, Western blot analysis was carried out using a monoclonal anti-NS4A antibody. The presence of non-proteolysed C-NS4A product was confirmed using a

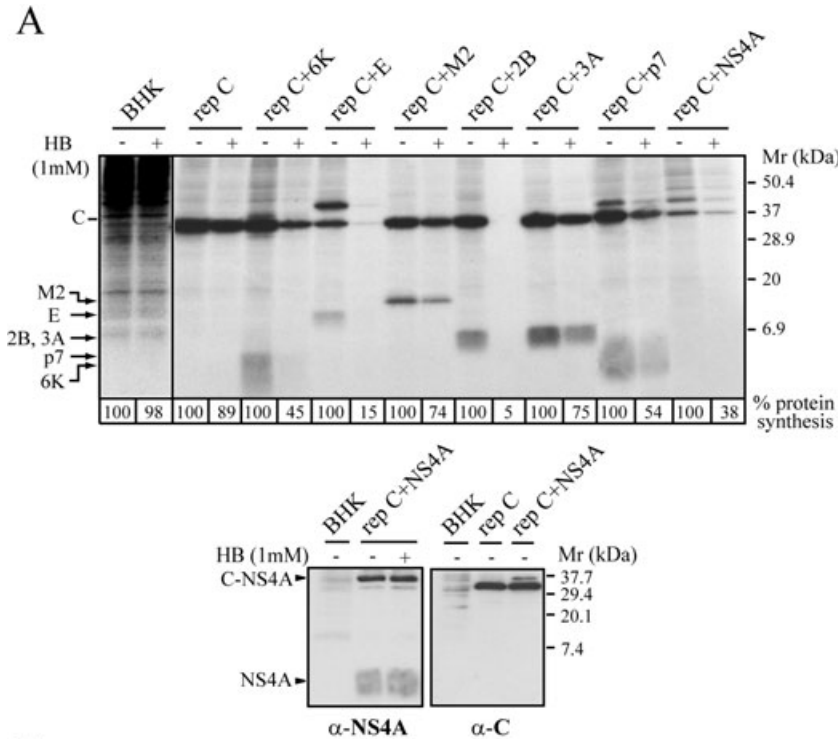
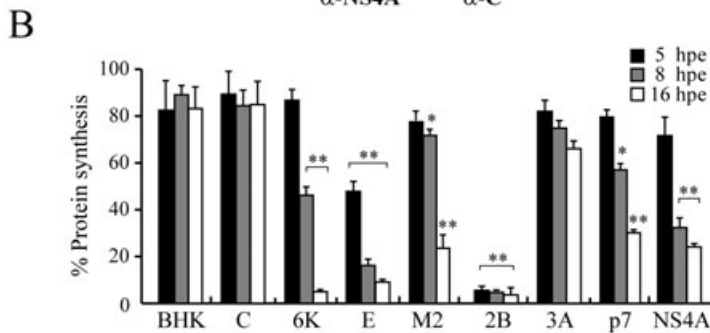


Fig. 2. Membrane permeabilization induced by different viroporins in BHK cells. BHK cells were electroporated with *in vitro*-synthesized RNA from the different constructs shown in Fig. 1. At 4, 7 or 15 hpe, proteins were labelled with [³⁵S]Met/Cys in the absence (-) or presence (+) of 1 mM HB for 40 min. Samples were processed by SDS-PAGE (17.5%), followed by fluorography and autoradiography.

A. Membrane permeabilization assayed by the inhibition of translation as a result of HB entry induced by viroporins at 8 hpe. As negative controls, the cells were electroporated with transcription buffer alone (BHK) or with rep C. The numbers below each lane indicate the percentages of protein synthesis obtained by dividing the values obtained by densitometry in HB-treated cells by the values obtained in untreated cells. Expression of NS4A and the non-proteolysed product C-NS4A at 8 hpe were analysed by Western blot using a monoclonal anti-NS4A antibody and a rabbit polyclonal anti-C antibody respectively (lower panels).

B. Statistical analysis of membrane permeabilization caused by the indicated viroporins at different time points. Each bar represents the percentage of protein synthesis in HB-treated cells compared with untreated cells. The SV C protein or cellular proteins in the case of control BHK cells were quantified by densitometry. All data are shown as the mean ± SD of three independent experiments. **P* < 0.05, ***P* < 0.005. Mr, molecular weight markers.



rabbit serum against the C protein (Fig. 2A, lower panels). Notably, the powerful permeabilization to HB induced by PV 2B protein from 5 hpe led to almost total inhibition of protein synthesis (Fig. 2B). MHV-A59 E protein also promoted significant entry of HB at 5 hpe that was increased at 8 hpe, when translation was inhibited by HB to about 15% of control. The presence of small amounts of mature E protein alongside significant quantities of the non-proteolysed product C-E was sufficient to permeabilize BHK cells (Fig. 2A). The precursor C-E itself is probably also capable of permeabilizing BHK cells. The other viral proteins analysed exhibited a delayed permeabilization activity compared with 2B or E proteins. For example, the well-known viroporin 6K caused increasing levels of permeabilization beginning soon after electroporation, but membrane permeability to HB was not profoundly altered until 16 hpe. Finally, IAV M2, HCV p7 and NS4A proteins all caused entry of HB to a similar extent at 16 hpe, leading to 70–75% inhibition of protein synthesis. HCV p7 also has viroporin activity in bacterial cells. Specifically, expression of p7 in *Escherichia coli* resulted in membrane permeabilization to HB and [³H] choline, ultimately promoting cell lysis (data not shown). Despite the low expression of NS4A, inhibition of translation by HB was about 62% at 8 hpe (Fig. 2B). Previous works have reported that NS4A inhibits translation in mouse and Huh-7 cells (Kato *et al.*, 2002; Kou *et al.*, 2006). Therefore, it is possible that NS4A interferes with translation of subgenomic mRNA in BHK cells. HB did not enter control BHK cells transfected with either transcription buffer alone or with RNA encoding only the C protein (Fig. 2A and B). These results indicate that p7 and NS4A from HCV are able to permeabilize mammalian cells. In contrast, PV 3A did not lead to significant cell permeabilization, as indicated by the 34% inhibition of protein synthesis due to HB at 16 hpe.

Viroporins promote apoptosis in BHK cells

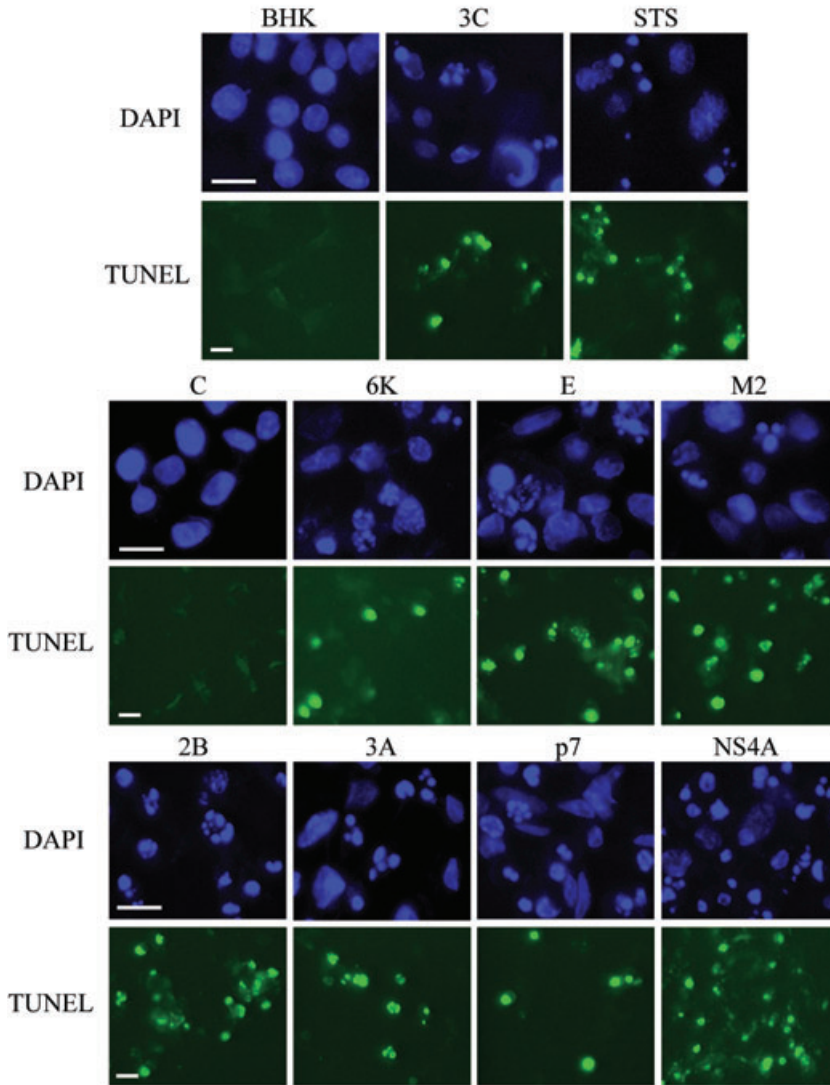
An increasing number of viral proteins have been described to be endowed with apoptotic or anti-apoptotic functions. HBx protein from hepatitis B virus (HBV), E1[^]E4 from human papillomavirus, and SV glycoproteins are examples of pro-apoptotic proteins, whereas M11L from myxoma virus, F1L from vaccinia virus, and BHRF1 from Epstein-Barr virus represent anti-apoptotic proteins (Boya *et al.*, 2004). Thus far, the viroporins MHV-A59 E and Vpu from HIV-1 have been reported to induce apoptosis (An *et al.*, 1999; Akari *et al.*, 2001). The aim of the present work was to assay the pro-apoptotic activity of other proteins with pore-forming properties. Chromatin condensation and nuclear DNA fragmentation with the appearance of apoptotic bodies were first analysed as typical cytological markers of programmed cell death. The nuclei of cells expressing the different viroporins selected

in this study were stained with DAPI at 16 hpe and their morphology was examined. Control BHK cells and cells expressing C protein exhibited normal rounded nuclei. In contrast, all viroporins led to clear signs of apoptosis, as also occurred in positive-control cells expressing PV 3C^{pro} (Barco *et al.*, 2000) or MHV-A59 E protein, as well as in cells treated with staurosporine (Fig. 3A). To further test whether viroporin-mediated cell death was due to apoptosis, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labelling (TUNEL) assay was carried out using fluorescence microscopy. An amount of TUNEL-positive cells that was comparable to, but slightly lower than, the number with fragmented nuclei was detected at 16 hpe (Fig. 3A and B). The proportion of apoptotic cells was variable, depending on the viroporin analysed. Thus, the strongest apoptotic response was observed with PV 2B, 3A and HCV NS4A, whereas E, M2, 6K and p7 induced apoptosis in a lower proportion of cells (Fig. 3B). It should be noted that about 10% and 35% of the cells that expressed 2B and NS4A respectively were TUNEL-positive at 8 hpe (data not shown). The proportion of apoptotic cells induced by the other viroporins was not significant at that time. Moreover, measurement of annexin V binding also revealed that the highest numbers of both annexin V-positive cells and cells with fragmented and condensed nuclei were around 32% and 43% after 2B and NS4A expression respectively (data not shown). These results indicate that all viroporins tested can induce apoptosis of BHK cells, but 2B and NS4A are particularly powerful and rapid inducers of programmed cell death.

Activation of caspase-3 by viroporins

Activation of caspases, a family of cysteine proteases, plays a central role in the execution of apoptosis (Cohen, 1997). To assess the involvement of caspases in viroporin-induced apoptosis, we examined activation of the effector caspase-3. Hydrolysis of translation initiation factor 4G1 (eIF4G1) is a typical phenomenon observed in apoptotic cells. Activated caspase-3 cleaves eIF4G1 at two different sites to generate characteristic fragments (Marissen and Lloyd, 1998). Thus, cleavage of eIF4G1 was tested by Western blotting in cells expressing different viroporins (Fig. 4A). Previous analyses of eIF4G1 using specific antibodies have revealed the existence of two proteins of ~220 and ~150 kDa in BHK cells. As described earlier, eIF4G1 exhibits different mobility patterns in SDS-PAGE of mammalian cells, possibly due to post-translational modifications (Castello *et al.*, 2006a). At 16 hpe, eIF4G1 was cleaved in viroporin-expressing cells to generate two cleavage products that migrate below the 50 kDa marker, as occurred in cells treated with inducers of apoptosis such as actinomycin D (ActD) and cycloheximide (CHX) (Fig. 4A). Cleavage of eIF4G1 also occurs in

A



B

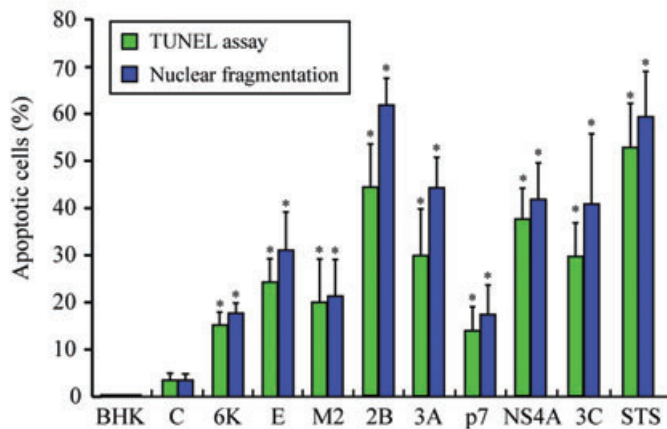
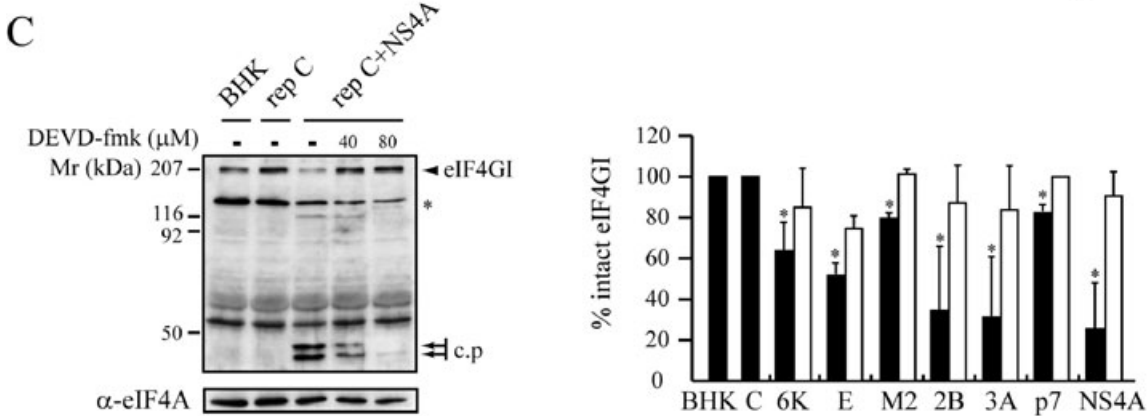
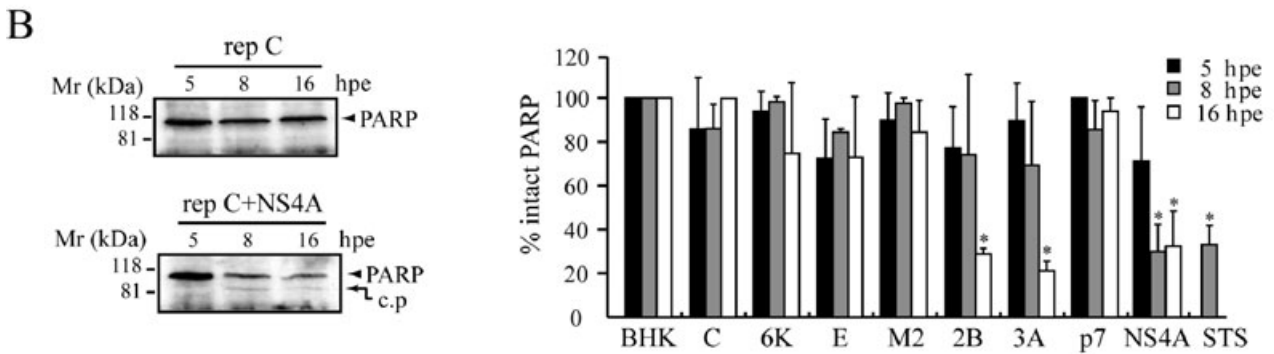
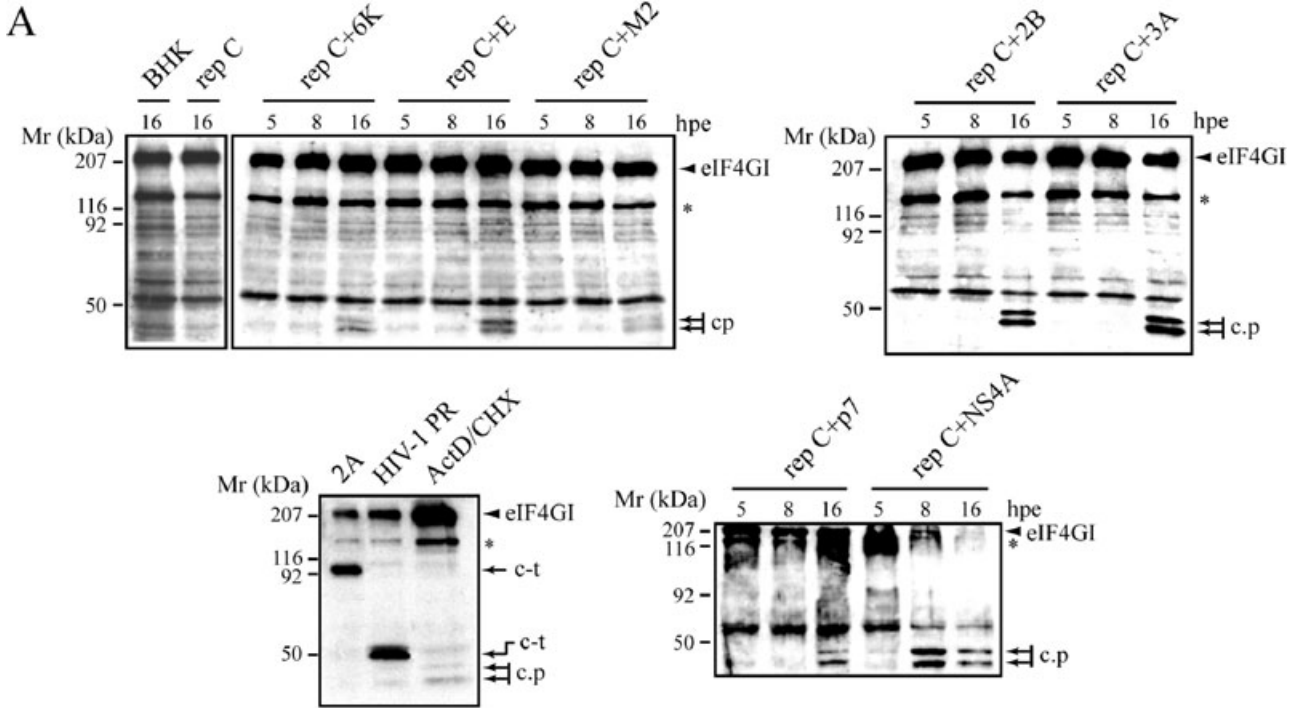


Fig. 3. Nuclear fragmentation in BHK cells upon expression of different viroporins. A. Detection of apoptotic cells by DAPI staining and TUNEL assay. BHK cells were electroporated with the indicated viroporin replicons. At 16 hpe, the cells were fixed and permeabilized, and TUNEL assay was performed (see *Experimental procedures*). Cells were stained with $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ DAPI. Cells expressing C protein or electroporated with transcription buffer alone (BHK) served as negative controls. Cells electroporated with rep C + 3C^{pro}, which express PV 3C^{pro}, and cells treated with $1 \mu\text{M}$ staurosporine (STS) for 23 h were used as positive controls. B. Percentage of TUNEL-positive cells and cells showing nuclear fragmentation (mean \pm SD). * $P < 0.005$.



cells infected with picornaviruses or retroviruses through the action of different viral proteases (Etchison *et al.*, 1982; Ventoso *et al.*, 2001; Alvarez *et al.*, 2003). Consequently, eIF4GI cleavage products observed in cells transfected with SV replicons that express either PV 2A^{pro} or

HIV-1 PR differ from those detected in viroporin-expressing cells (Fig. 4A, left lower panel) (Castello *et al.*, 2006b). Notably, NS4A again acted as a potent inducer of apoptosis, such that apoptotic eIF4GI fragments could already be detected from 5 hpe and their presence was

Fig. 4. Activation of caspase-3 induced by several viroporins. Whole-cell lysates from BHK cells expressing viroporins at 5, 8 or 16 hpe were processed by SDS-PAGE. Cells expressing C protein or electroporated with transcription buffer alone (BHK) served as negative controls.

A. Cleavage of eIF4GI mediated by caspase-3 activation. Two eIF4GI apoptotic cleavage products (c.p) were detected by Western blotting using a polyclonal anti-eIF4GI antibody. In the lower left panel, the cleavage products of eIF4GI generated by viral proteases (PV 2 A and HIV-1 PR) are shown. c-t, eIF4GI carboxyl-terminal fragment. As positive controls, cells were incubated with $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ActD and $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ CHX for 16 h to induce apoptotic cleavage of eIF4GI by caspase-3. The 150 kDa protein related to eIF4GI is indicated with an asterisk.

B. Cleavage of PARP in BHK cells expressing viroporins. Proteolysis of PARP was analysed by Western blotting using a monoclonal anti-PARP antibody. A representative experiment shows early PARP cleavage induced by NS4A expression (left panel). c.p, apoptotic PARP cleavage product. The percentage of intact PARP at 5, 8 and 16 hpe was calculated by densitometry of the PARP band (right diagram). Cells treated with $2 \mu\text{M}$ staurosporine (STS) for 8 h were used as positive controls (mean \pm SD of three independent experiments). * $P < 0.05$.

C. Inhibition of eIF4GI cleavage. Cells expressing the indicated viroporins were treated with or without DEVD-fmk ($40 \mu\text{M}$) at 4 hpe and incubated for 12 h at 37°C . Cell lysates were analysed by Western blotting using anti-eIF4GI antibodies. Inhibition of early eIF4GI cleavage in cells expressing NS4A at 8 hpe (left panel). To measure protein loading, eIF4A or α -tubulin (not shown) were detected. Percentage of eIF4GI intact in untreated (solid bars) and DEVD-fmk-treated cells (grey bars) at 16 hpe was calculated by densitometry of the eIF4GI bands. Each bar shows the percentage of intact eIF4GI compared with control BHK cells (mean \pm SD of three independent experiments). * $P < 0.05$.

even clearer at 8 hpe. This result is consistent with the observation of a significant number of TUNEL-positive cells at 8 hpe following transfection with rep C + NS4A (data not shown). However, at these early times, there was no evidence of eIF4GI proteolysis in cells transfected with other viroporins.

Poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) is another well-characterized caspase-3 substrate. Although all the viroporins tested induced hydrolysis of eIF4GI, only expression of PV 2B, 3A and NS4A led to significant PARP cleavage at 16 hpe. NS4A was a powerful inducer of apoptosis, because a notable reduction in the level of intact PARP was already observed at 8 hpe (Fig. 4B). The ~ 89 kDa cleavage product detected in these cells corresponds to that described for PARP proteolysis by caspase-3 (Boulares *et al.*, 1999). Taken together, these results indicate that eIF4GI is possibly a better substrate for caspase-3 than PARP. Furthermore, caspase-3 activation was indicated by the observation that DEVD-fmk, an irreversible cell-permeable inhibitor of caspase-3, efficiently blocked eIF4GI cleavage induced by NS4A and the other viroporins at 8 and/or 16 hpe (Fig. 4C). Because transfection of rep C did not cause proteolysis of either eIF4GI or PARP, our findings indicate that viroporins activate caspase-3.

Association of viroporins with mitochondria

Most viroporins are described to be located mainly in the internal membrane systems, i.e. ER, ERGIC or Golgi apparatus, and to a lesser extent at the plasma membrane (Yu *et al.*, 1994; Gonzalez and Carrasco, 2003). However, in the last few years, HCV p7 protein and several viral pro-apoptotic proteins have been also found to be partially associated with mitochondria (Griffin *et al.*, 2004; D'Agostino *et al.*, 2005). Therefore, we decided to explore the involvement of the mitochondrial pathway in apoptosis induced by viroporins. First, we tested the possible colocalization of 2B and NS4A with Mitotracker and other organelle markers (Fig. 5A–F). Both proteins partially colocalized with Mitotracker in BHK (Fig. 5C and F) and Huh-7 cells (data not shown). Interestingly, in both

2B- and NS4A-expressing cells, mitochondria did not exhibit their typical long shape, appearing instead as punctate entities (Fig. 5, compare distribution of Mitotracker in C, F and G with control BHK cells in G, upper left panel). In addition, it should be noted that 2B and p7 expression also led to accumulation of mitochondria around the nucleus or at nuclear poles respectively (Fig. 5C and G). 2B was also present in the ER and predominantly in the Golgi, while NS4A colocalized with ER but appeared to be excluded from the Golgi (Fig. 5A, B, D and E). Mitochondrial localization of the other viroporins was also analysed. Unlike 2B and NS4A, none of the other viroporins analysed colocalized with mitochondria (data not shown). However, the expression of 6K, E and 3A altered the normal morphology of mitochondrial network (Fig. 5G, compare viroporin-expressing cells with normal BHK or C-expressing cells).

Cytochrome *c* release from mitochondria in cells expressing viroporins

Disruption of the mitochondrial transmembrane potential and permeabilization of the outer mitochondrial membrane lead to the release of apoptogenic factors, such as cytochrome *c*, from the intermembrane space to the cytosol (Zamzami and Kroemer, 2001). Therefore, the distribution of cytochrome *c* in cells expressing viroporins was studied by immunostaining. In cells transfected with transcription buffer alone or which express C protein alone, cytochrome *c* is usually present in long structures corresponding to mitochondria dispersed throughout the cytoplasm (Fig. 6A). Interestingly, the distribution of cytochrome *c* changed drastically in viroporin-transfected cells and was found to be spread throughout the entire cytoplasm, as observed in ActD–CHX-positive control cells (Fig. 6A, white arrows). Notably, 16 h after expression of PV 2B, 3A and NS4A, nearly 60% of the cells had released cytochrome *c*, while in the case of NS4A, a similar proportion was observed as early as 7 hpe (Fig. 6B and data not shown). About 10% of cells that synthesized SV 6K and HCV p7 exhibited a diffuse staining pattern at

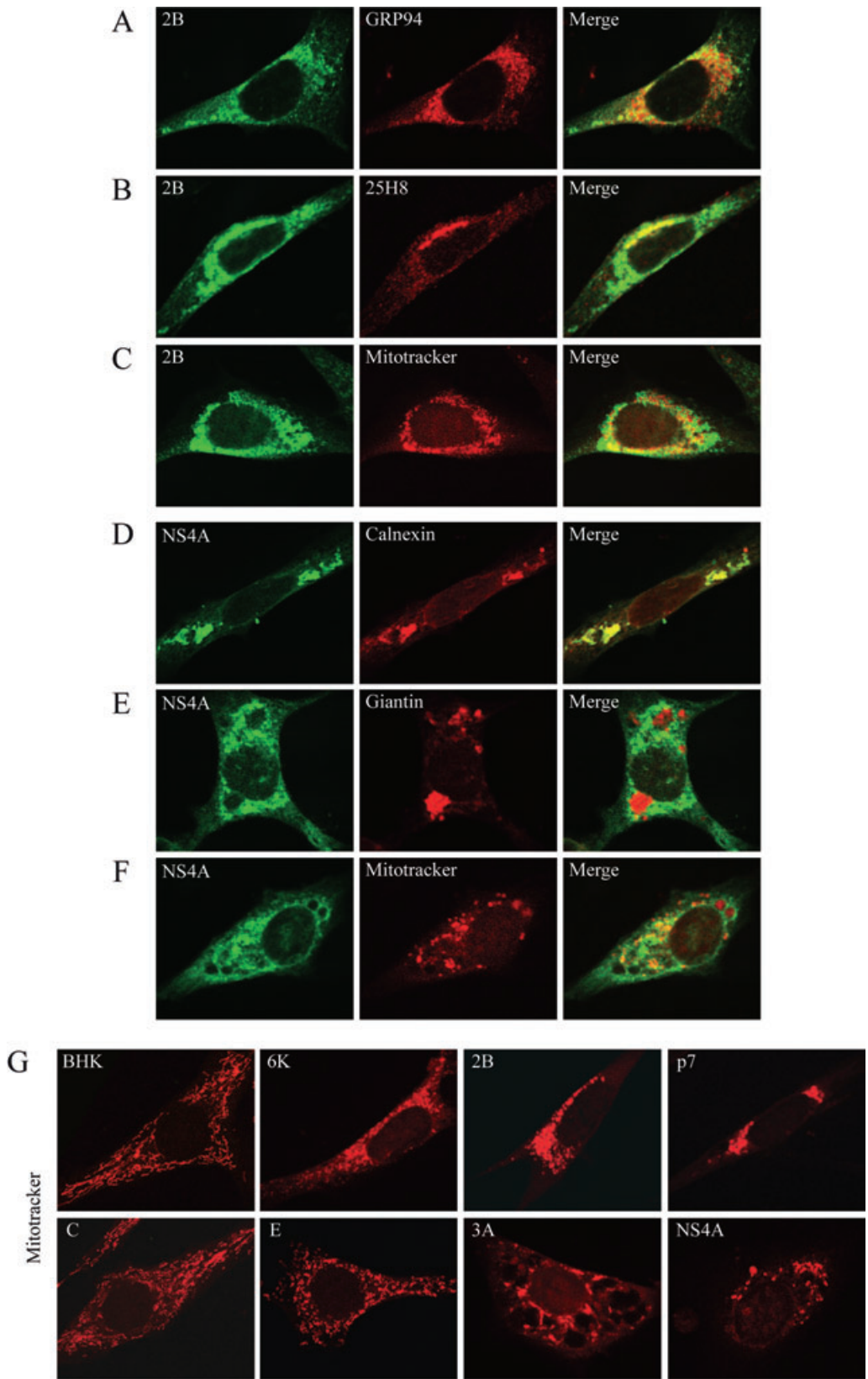


Fig. 5. Colocalization of PV 2B and HCV NS4A proteins with mitochondrial and organelle markers. BHK cells expressing PV 2B (A–C) or HCV NS4A (D–F) were fixed at 8 hpe, permeabilized and double-stained with anti-2B and anti-NS4A antibodies respectively, and different organelle markers. Antibodies against GRP94 and calnexin were used as ER markers (A, D). Antibody 25H8 and anti-giantin antibodies were used as Golgi markers (B, E). Cells were incubated prior to fixation for 45 min with Mitotracker Red to stain mitochondria (C, F). Overlaid images are shown on the right.

G. Mitochondria staining in cells transfected with viroporin replicons at 16 hpe.

16 hpe, while pro-apoptotic E protein and IAV M2 induced cytochrome *c* release in a slightly higher proportion (~20%). These results are in accordance with our findings regarding the activation of caspase-3. Therefore, mitochondrial alterations and cytochrome *c* efflux strongly suggest involvement of the mitochondrial pathway in apoptosis induced by viroporins.

Discussion

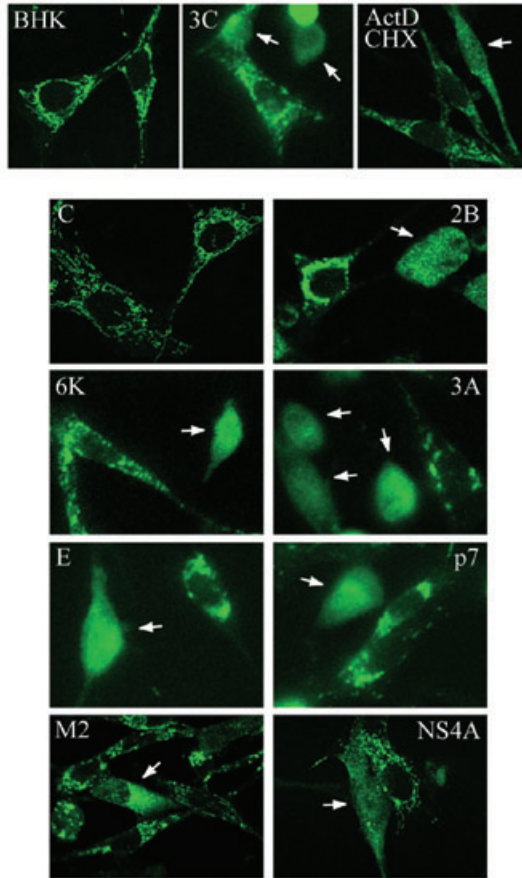
Recent studies have elucidated a novel role for changes in intracellular ion homeostasis as important modulators of the cell death programme (Franco *et al.*, 2006). Our present results provide new evidence that viroporins induce apoptotic cell responses. Five viroporins (SV 6K, MHV-A59 E, IAV M2, and PV 2B and 3A) encoded by different RNA viruses, as well as two potential viroporins, p7 and NS4A from HCV, were expressed in mammalian cells by means of a SV-derived replicon. Our findings provide evidence that p7 and NS4A from HCV enhance membrane permeability in BHK cells. These results agree well with reports that p7 assembles cation-selective ion channels in membranes, leading to increased membrane permeability of bacterial cells (Clarke *et al.*, 2006; Madan, 2006). Although HCV NS4A fulfils many features of viroporins, its ability to assemble membrane pores still remains unexplored. The extent and time-course of membrane permeabilization depend on the viroporin tested. Thus, the viroporins analysed can be classified in two groups: those that induce rapid permeabilization, and those in which permeabilization is induced more slowly. The first group includes PV 2B and MHV-A59 E, because both polypeptides efficiently permeabilized the plasma membrane soon after their synthesis. In contrast, SV 6K, IAV M2, and HCV p7 and NS4A required a longer period of expression to exert extensive membrane permeabilization. PV 3A has the capacity to perturb bacterial membranes (Lama and Carrasco, 1992), but it does not lead to significant permeabilization of either BHK-21 cells (this study) or HeLa cells (Aldabe *et al.*, 1996). The lack of activity of PV 3A in mammalian cells, even after a long period of expression, may be due to its efficient inhibition of ER-to-Golgi transport, thereby interfering with the localization of 3A itself at the plasma membrane (Doedens *et al.*, 1997). Alternatively, the delivery of 3A to the plasma membrane may require the presence of other PV proteins. Notably, PV 2B displayed the highest permeabilizing capacity.

Picornavirus 2B also exhibits anti-secretory activity, but in this case the inhibition is only partial (Cornell *et al.*, 2006). 2B is endowed with a potent capacity to cause profound and rapid alterations in cellular ion homeostasis. Thus, CV 2B induces Ca^{2+} release from intracellular stores (ER and Golgi) and subsequent extracellular Ca^{2+} influx to the cytoplasm (van Kuppeveld *et al.*, 1997). Therefore, a generalized permeabilization of both intracellular compartments and plasma membrane mediated by 2B can provoke an ionic imbalance, leading to disruption of the permeability barrier.

Several cellular ion channels participate in apoptotic cell death (Lang *et al.*, 2003). Perturbation of ion homeostasis is a common hallmark of apoptosis, giving rise to depolarization of the plasma membrane associated with intracellular cation overload and cell volume decreases due to anion and H_2O efflux (Waring, 2005; Burg *et al.*, 2006; Franco *et al.*, 2006). Therefore, deregulation of ion channels provokes various pathological conditions or channelopathies (Jentsch *et al.*, 2004). Our data indicate that several viroporins trigger programmed cell death in BHK cells. Consistent with these findings, coronavirus E protein was described as an inducer of apoptosis before its viroporin activity was uncovered (An *et al.*, 1999). The viroporins tested in this study produced both DNA fragmentation and generation of apoptotic bodies, as revealed by TUNEL assay and DAPI staining, after several hours of expression in BHK cells. Furthermore, cleavage of eIF4G1 and PARP indicated that viroporin-induced apoptosis was dependent on caspase activation. The fact that the inhibitor DEVD-fmk abrogated eIF4G1 cleavage provides further evidence supporting the involvement of caspase-3 in this process. Notably, the most rapid induction of caspase-3 activation was seen with HCV NS4A, followed by PV 2B and 3A. These results agree well with the recent finding that NS4A renders Huh-7 cells prone to undergo apoptosis (Nomura-Takigawa *et al.*, 2006). It is possible that the ability of NS4A to inhibit host and viral translation (Kou *et al.*, 2006), together with its permeabilizing capacity, accounts for the rapid development of apoptosis. Consistent with our findings, a number of viral pro-apoptotic proteins contain amphipathic α -helices that have potential pore-forming properties, as occurs with both Vpr from HIV-1 and HBx from HBV (Boya *et al.*, 2004).

Our present findings indicate that membrane permeabilization takes place before the appearance of clear signs

A



B

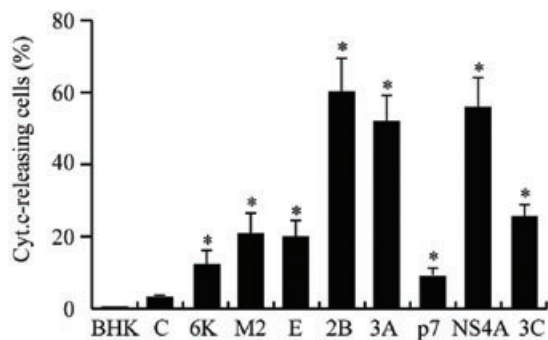


Fig. 6. Cytochrome *c* release in cells expressing viroporins. A. BHK cells expressing the different viroporins as well as PV 3C^{pro} (upper middle panel) were fixed at 16 hpe, permeabilized and incubated with mouse anti-cytochrome *c* antibodies and secondary Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG. Cells treated with 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ActD and 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CHX, or 3C-expressing cells were used as positive controls (upper right and middle panels). Cells expressing C protein or electroporated with transcription buffer alone (BHK) served as negative controls. Arrows indicate cells in which efflux of cytochrome *c* is clearly observed. B. Percentage of cells exhibiting cytochrome *c* release (mean \pm SD). * $P < 0.05$.

of apoptosis (i.e. caspase activation). The permeabilizing capacity of 2B, 6K, M2 and p7 was proportional to the degree of cell death observed in each case. However, a large number of cells expressing 3A underwent apoptosis, despite the fact that no significant plasma membrane permeabilization was detected. Most probably, inhibition of the vesicular transport system by PV 3A also activates alternative apoptotic pathways. Consistent with this possibility, a recent report indicated that mutations in GABA(A) receptors lead to retention of channel molecules in the ER, thereby causing ER stress followed by apoptosis (Hirose, 2006). On the other hand, coronavirus E induced efficient membrane permeabilization but did not provoke apoptosis in a high proportion of cells. These findings may suggest that besides induction of permeability changes, some viroporins could exert other effects on cellular functions to regulate the degree of apoptosis progression. Nevertheless, the pro-apoptotic activity of each viroporin alone might be weakened or enhanced in the context of viral infection, where other pro-apoptotic or anti-apoptotic viral proteins can coexist.

The partial association of HCV p7 and NS4A with mitochondria has been reported previously (Griffin *et al.*, 2004; Nomura-Takigawa *et al.*, 2006). Our study revealed that a low proportion of NS4A not only colocalized with mitochondria in BHK cells but also produced mitochondria fragmentation. NS4A was abundant in the ER but was excluded from the Golgi compartment. Notably, we found that 2B protein was also associated with mitochondria and induced a perinuclear redistribution of these organelles. A similar anomalous organization of the mitochondrial network was observed in cells expressing HCV p7, PV 3A or SV 6K, suggesting that viroporins may cause mitochondrial alterations. In accordance with these results, several pro-apoptotic viral proteins, such as HBV HBx or E1^EE4 protein from human papillomavirus, also induce dramatic alterations in mitochondrial morphology during the early stages of apoptosis (Takada *et al.*, 1999; Karbowski and Youle, 2003; Raj *et al.*, 2004). Furthermore, we found that 2B, 3A and NS4A triggered the release of cytochrome *c* in a high proportion of cells. The other viroporins also induced this mitochondrial response but affected a lower number of cells. Therefore, the present work suggests that viroporin expression induces mitochondria-mediated apoptosis.

In contrast to our findings that PV viroporins induce apoptosis in BHK cells, an anti-apoptotic effect mediated by picornavirus 2B and 3A has been reported in HeLa cells (Neznanov *et al.*, 2001; Campanella *et al.*, 2004). Several possibilities can be put forward to account for these apparent discrepancies. It is possible that a critical intracellular level of PV viroporins is required to trigger anti-apoptotic or apoptotic pathways. Thus, transfection of plasmids or mRNAs renders a relatively low expression of 3A and 2B, which may result in their lack of effect or even

inhibition of apoptosis (Neznanov *et al.*, 2001; Campanella *et al.*, 2004; Salako *et al.*, 2006). However, in the present study the use of a SV-derived replicon (rep C + 2B) guaranteed high expression of PV 2B protein, similar to that found during PV infection, leading to clear signs of apoptosis in transfected cells. Campanella and coworkers demonstrated that CV 2B expression decreases the Ca²⁺ content of both ER and the Golgi stores, and that this results in downregulation of Ca²⁺ signalling to mitochondria and prevents apoptosis (Campanella *et al.*, 2004). Our findings provide evidence for a novel effect of 2B in mitochondria. The localization of a pool of 2B in mitochondria could directly affect their membrane permeability and disrupt Ca²⁺ regulation. Ca²⁺ plays an important role in the regulation of mitochondrial connectivity during apoptosis (Pinton *et al.*, 2001; Rapizzi *et al.*, 2002). Consistent with this possibility, 2B altered the normal mitochondrial network pattern. Pro-apoptotic HBx protein from HBV also associates with mitochondria and mediates alteration of cytosolic calcium, which is a fundamental requirement for viral replication (Bouchard *et al.*, 2001). A given viral protein may exhibit anti- or pro-apoptotic activities depending on several factors, as is the case in NS1 from IAV and HIV-1 Vpr (Lowy, 2003; Moon and Yang, 2006). This dual behaviour may have a physiological significance for viral replication. During the early phase of infection when the expression level of PV proteins is low, 2B and 3A may protect infected cells from apoptosis, thereby permitting RNA replication. However, at later stages, when high levels of viroporins are synthesized and permeabilization of cells is evident (Lopez-Rivas *et al.*, 1987; Carrasco, 1995), both 2B and 3A, together with 3C^{pro} and 2A^{pro}, lead to induction of apoptosis in the infected cells (Barco *et al.*, 2000; Calandria *et al.*, 2004). Thus, apoptosis induced by 3C^{pro}, 2A^{pro}, 2B and 3A could represent an efficient mechanism for the spread of PV virions, avoiding host immune inflammatory responses. The cell line used could also influence the development of apoptosis. Moreover, the reaction of the host apoptotic machinery to picornavirus infection has been reported to be generally cell-dependent and affected by the cell's environment, the status of its differentiation, and the genotype (Romanova *et al.*, 2005). In agreement with our results, the apoptotic programme induced by PV in murine cells involves damaged mitochondria, efflux of cytochrome *c*, and activation of caspase-9, followed by activation of downstream effector caspases. The existence of possible interactions between viroporins and mitochondrial factors or some other endogenous proteins will open an interesting field of investigation that may lead us to a better understanding of virus biology and the role of ionic alterations during infection. Further studies of viroporins and their apoptotic effects could help to clarify the pathogenesis of different viral diseases and will lay the

foundations for the development of novel antiviral compounds to block viroporin activity.

Experimental procedures

Cell culture and SV replicons

Baby hamster kidney (BHK)-21 cells were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS) and non-essential amino acids.

Five SV replicons containing the sequences coding for 2B and 3C proteins from PV (strain Mahoney-1), M2 protein from IAV, and p7 and NS4A proteins from HCV type b (Con1 isolate, gift from Dr R. Bartenschlager, Johannes-Gutenberg University, Mainz, Germany) were obtained by cloning the NdeI/BamHI-digested PCR fragment, encoding each protein, after the sequence encoding the SV C protein in the plasmid pH 3'2 J-C (Sanz and Carrasco, 2001), using the same restriction sites. In a second step, a fragment digested with AatII and XhoI was inserted into AatII/XhoI-digested pT7SVwt vector (Sanz and Carrasco, 2001) to finally generate the plasmids pT7SVrep C + 2B, pT7SVrep C + 3C, pT7SVrep C + M2, pT7SVrep C + p7 and pT7SVrep C + NS4A. Replicons encoding 6K protein from SV, E protein from MHV-A59 or only C protein have been described elsewhere (Madan *et al.*, 2005a). Plasmid inserts from PCR amplifications were confirmed by sequencing with standard techniques.

Antibodies

Specific rabbit polyclonal antibodies against the PV protein 2B were obtained by inoculation of maltose binding protein–2B fusion proteins (Barco and Carrasco, 1995). Mouse monoclonal antibodies against HCV NS4A protein were generously provided by A.A. Kushch (Ivanovsky Institute of Virology, Moscow, Russia). Rat monoclonal antibodies against GRP94 (Affinity BioReagents) and rabbit polyclonal antibodies against calnexin (Stressgen) were used as organelle markers for ER. Mouse monoclonal antibodies 25H8 (a generous gift from I.V. Sandoval, Centro de Biología Molecular, Madrid, Spain) and rabbit polyclonal antibodies against giantin (Abcam) were used as Golgi markers. Alexa 488- or Alexa 555-conjugated goat anti-mouse, anti-rabbit and anti-rat IgG (Molecular Probes) were used as secondary antibodies.

Transfection of BHK-21 cells

Baby hamster kidney (BHK)-21 cells were electroporated with *in vitro*-synthesized mRNAs. Transcription reactions were carried out with T7 RNA polymerase (Promega) and the corresponding plasmids as templates, according to the manufacturer's instructions. Subconfluent cells were harvested, washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), and resuspended in PBS at a density of approximately 2.5×10^6 cells ml⁻¹. An aliquot (50 µl) of transcription mixture containing 15 µg RNA from each of the different DNA replicons was added to 0.4 ml of cell suspension. This mixture was transferred to a 2 mm electroporation cuvette (Bio-Rad). Electroporation was performed at room temperature (RT) by generating two consecutive 1.5 kV, 25 µF pulses using a Gene Pulser apparatus (Bio-Rad), as previously described (Liljestrom and Garoff, 1991). Finally, cells were diluted

in DMEM supplemented with 10% FCS and seeded onto culture plates. Control BHK cells were electroporated with 50 μ l transcription buffer in PBS.

Permeabilization assay

Baby hamster kidney (BHK) cells electroporated with the corresponding RNA synthesized *in vitro* from the different constructs or with transcription buffer alone were further seeded in wells of an L-24 plate. At different time points, cells were pretreated with 1 mM HB (Clontech) for 20 min at 37°C, or left untreated. Next, proteins were radiolabelled for 40 min with 10 μ Ci [³⁵S]Met/Cys (Promix; Amersham Pharmacia) in methionine/cysteine-free DMEM in the presence or absence of 1 mM HB. Finally, cells were collected in sample buffer, boiled for 4 min and analysed by SDS-PAGE (17.5%) and fluorography. Protein synthesis was quantified by densitometry using a GS-710 calibrated Imaging Densitometer (Bio-Rad) and calculated by dividing the values obtained for samples treated with HB by the corresponding values obtained from untreated cells. Protein synthesis was quantified by densitometry of either the C protein band or a cellular protein band.

Analysis of apoptosis

Changes in nuclear morphology and appearance of apoptotic bodies were assessed by DAPI staining of culture cells. BHK cells grown on coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 15 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 5 min and stained with DAPI (0.5 μ g ml⁻¹) at RT for 2 min. The morphology of the cell nuclei was examined with a fluorescence Axiovert 200 inverted microscope (Zeiss). The protein synthesis inhibitor CHX (100 μ g ml⁻¹) and the transcription inhibitor actinomycin D (5 μ g ml⁻¹), or staurosporine (1 μ M), were used as non-viral inducers of apoptosis.

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labelling (TUNEL) assay

Cells electroporated with the different SV replicons (RNAs synthesized *in vitro*) were seeded on coverslips and incubated at 37°C. For detection of apoptosis, TUNEL assay was performed using the Fluorescein FragEL™ DNA Fragmentation Detection kit (Clontech) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 18 h after electroporation, BHK cells were fixed with 4% PFA, permeabilized with 0.2% Triton X-100 at RT and rinsed with Tris-buffered saline (TBS; Tris 20 mM, pH 7.4 plus 140 mM NaCl). After equilibration for 20 min at RT, cells were overlaid with 60 μ l of terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-labelling reaction mix containing 3 μ l of TdT enzyme and incubated in a humidified chamber for 60 min at 37°C. Coverslips were incubated in TBS for 1 min at RT and washed again twice with TBS before DAPI staining (described above). Finally, coverslips were mounted in Moviol/DABCO (Calbiochem), and apoptotic nuclei were analysed by fluorescence microscopy. To obtain the percentages of TUNEL-positive cells and DAPI-positive cells (apoptotic cells), cells of 10 random fields (approximately 1000–1500 cells) were counted in each sample. Results were all expressed as means \pm SD.

Immunofluorescence microscopy

Baby hamster kidney (BHK) cells electroporated with the SV replicons were seeded on coverslips, fixed in 4% PFA for 15 min, washed twice in PBS, and then permeabilized for 10 min with 0.2% Triton X-100 in PBS. All antibody incubations were carried out for 1 h in PBS containing 0.1% FCS and 0.1% Triton X-100. Coverslips were washed three times with PBS between primary and secondary antibody incubations. For mitochondria staining, cells were incubated with 2 μ M Mitotracker Red CMH₂Ros (Molecular Probes) for 45 min before fixation. Anti-cytochrome c monoclonal antibodies (BD Pharmingen, clone 6H2.B4) were diluted 1:100 and incubated for 2 h. Coverslips were mounted in ProLong Gold anti-fade reagent (Invitrogen) and examined with a Radiance 2000 (Bio-Rad/Zeiss) confocal laser scanning microscope.

Western blotting

Electroporated cells expressing the different viral proteins were collected in sample buffer at the same times indicated for the permeabilization assay and the lysates were processed by SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane as described previously (Barco and Carrasco, 1995). The integrity of two caspase-3 substrates, eIF4G1 and PARP, was analysed using a rabbit anti-eIF4G1 serum raised against peptides derived from the N- and C-terminal regions of human eIF4G1 at a 1:1000 dilution and a mouse monoclonal anti-PARP antibody (BD Pharmingen) at a 1:350 dilution respectively. Antibodies against eIF4A at a 1:50 dilution (a gift from Dr H. Trachsel, Institute for Biochemistry and Molecular Biology, University of Berne, Switzerland) were used to evaluate protein loading. To detect HCV NS4A protein and SV C protein, monoclonal anti-NS4A antibodies (Masalova *et al.*, 2002) at a 1:1000 dilution and a polyclonal rabbit serum against the SV C protein at a 1:10 000 dilution were used. Incubation with primary antibodies was performed for 2 h at RT, then the membrane was washed three times with PBS containing 0.2% Tween-20 and incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse (Promega) or anti-rabbit IgG antibodies (Amersham) at a 1:10 000 dilution. After washing three times, protein bands were visualized with the ECL detection system (Amersham).

Statistical analysis

Data are presented as mean values \pm SD. Differences were tested for significance by means of the Student's *t*-test. Viroporin effects on BHK cells were compared with respect to the control (transfection of rep C). A probability level $P < 0.05$ was considered significant.

Acknowledgements

This study was supported by Grant BFU2006-02182/BMC from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica, Spain, and an Institutional Grant awarded to the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa by the Fundación Ramón Areces. A.C. is the holder of an FPI Fellowship.

References

- Agirre, A., Barco, A., Carrasco, L., and Nieva, J.L. (2002) Viroporin-mediated membrane permeabilization. Pore formation by nonstructural poliovirus 2B protein. *J Biol Chem* **277**: 40434–40441.
- Agol, V.I., Belov, G.A., Bienz, K., Egger, D., Kolesnikova, M.S., Raikhlin, N.T., *et al.* (1998) Two types of death of poliovirus-infected cells: caspase involvement in the apoptosis but not cytopathic effect. *Virology* **252**: 343–353.
- Akari, H., Bour, S., Kao, S., Adachi, A., and Strebel, K. (2001) The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor kappaB-dependent expression of antiapoptotic factors. *J Exp Med* **194**: 1299–1311.
- Aldabe, R., Barco, A., and Carrasco, L. (1996) Membrane permeabilization by poliovirus proteins 2B and 2BC. *J Biol Chem* **271**: 23134–23137.
- Alvarez, E., Menendez-Arias, L., and Carrasco, L. (2003) The eukaryotic translation initiation factor 4G1 is cleaved by different retroviral proteases. *J Virol* **77**: 12392–12400.
- An, S., and Chen, C.J., Yu, X., Leibowitz, J.L., and Makino, S. (1999) Induction of apoptosis in murine coronavirus-infected cultured cells and demonstration of E protein as an apoptosis inducer. *J Virol* **73**: 7853–7859.
- Arroyo, J., Boceta, M., Gonzalez, M.E., Michel, M., and Carrasco, L. (1995) Membrane permeabilization by different regions of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41. *J Virol* **69**: 4095–4102.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**: 1305–1308.
- Barco, A., and Carrasco, L. (1995) A human virus protein, poliovirus protein 2BC, induces membrane proliferation and blocks the exocytic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **14**: 3349–3364.
- Barco, A., Feduchi, E., and Carrasco, L. (2000) Poliovirus protease 3C (pro) kills cells by apoptosis. *Virology* **266**: 352–360.
- Bienz, K., Egger, D., Pfister, T., and Troxler, M. (1992) Structural and functional characterization of the poliovirus replication complex. *J Virol* **66**: 2740–2747.
- Bouchard, M.J., Wang, L.H., and Schneider, R.J. (2001) Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. *Science* **294**: 2376–2378.
- Boulares, A.H., Yakovlev, A.G., Ivanova, V., Stoica, B.A., Wang, G., Iyer, S., and Smulson, M. (1999) Role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem* **274**: 22932–22940.
- Boya, P., Pauleau, A.L., Poncet, D., Gonzalez-Polo, R.A., Zamzami, N., and Kroemer, G. (2004) Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death. *Biochim Biophys Acta* **1659**: 178–189.
- Burg, E.D., Remillard, C.V., and Yuan, J.X. (2006) K⁺ channels in apoptosis. *J Membr Biol* **209**: 3–20.
- Calandria, C., Irurzun, A., Barco, A., and Carrasco, L. (2004) Individual expression of poliovirus 2A_{pro} and 3C_{pro} induces activation of caspase-3 and PARP cleavage in HeLa cells. *Virus Res* **104**: 39–49.
- Campanella, M., de Jong, A.S., Lanke, K.W., Melchers, W.J., Willems, P.H., Pinton, P., *et al.* (2004) The coxsackievirus 2B protein suppresses apoptotic host cell responses by manipulating intracellular Ca²⁺ homeostasis. *J Biol Chem* **279**: 18440–18450.
- Carrasco, L. (1995) Modification of membrane permeability by animal viruses. *Adv Virus Res* **45**: 61–112.
- Carrere-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F., and Dubuisson, J. (2002) Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol* **76**: 3720–3730.
- Carthy, C.M., Granville, D.J., Watson, K.A., Anderson, D.R., Wilson, J.E., Yang, D., *et al.* (1998) Caspase activation and specific cleavage of substrates after coxsackievirus B3-induced cytopathic effect in HeLa cells. *J Virol* **72**: 7669–7675.
- Castello, A., Alvarez, E., and Carrasco, L. (2006a) Differential cleavage of eIF4G1 and eIF4GII in mammalian cells. Effects on translation. *J Biol Chem* **281**: 33206–33216.
- Castello, A., Sanz, M.A., Molina, S., and Carrasco, L. (2006b) Translation of Sindbis virus 26S mRNA does not require intact eukaryotic initiation factor 4G. *J Mol Biol* **355**: 942–956.
- Chang, Y.S., Liao, C.L., Tsao, C.H., Chen, M.C., Liu, C.I., Chen, L.K., and Lin, Y.L. (1999) Membrane permeabilization by small hydrophobic nonstructural proteins of Japanese encephalitis virus. *J Virol* **73**: 6257–6264.
- Choe, S.S., Dodd, D.A., and Kirkegaard, K. (2005) Inhibition of cellular protein secretion by picornaviral 3A proteins. *Virology* **337**: 18–29.
- Clarke, D., Griffin, S., Beales, L., Gelais, C.S., Burgess, S., Harris, M., and Rowlands, D. (2006) Evidence for the formation of a heptameric ion channel complex by the hepatitis C virus p7 protein *in vitro*. *J Biol Chem* **281**: 37057–37068.
- Cohen, G.M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326**: 1–16.
- Cornell, C.T., Kiesses, W.B., Harkins, S., and Whitton, J.L. (2006) Inhibition of protein trafficking by coxsackievirus b3: multiple viral proteins target a single organelle. *J Virol* **80**: 6637–6647.
- D'Agostino, D.M., Bernardi, P., Chieco-Bianchi, L., and Ciminale, V. (2005) Mitochondria as functional targets of proteins coded by human tumor viruses. *Adv Cancer Res* **94**: 87–142.
- DeDiego, M.L., Alvarez, E., Almazan, F., Rejas, M.T., Lamirande, E., Roberts, A., *et al.* (2007) A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated *in vitro* and *in vivo*. *J Virol* **81**: 1701–1713.
- Doedens, J.R., Giddings, T.H., Jr, and Kirkegaard, K. (1997) Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis. *J Virol* **71**: 9054–9064.
- Etchison, D., Milburn, S.C., Ederly, I., Sonenberg, N., and Hershey, J.W. (1982) Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220 000-dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *J Biol Chem* **257**: 14806–14810.
- Failla, C., Tomei, L., and De Francesco, R. (1994) Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol* **68**: 3753–3760.
- Fischer, F., Stegen, C.F., Masters, P.S., and Samsonoff,

- W.A. (1998) Analysis of constructed E gene mutants of mouse hepatitis virus confirms a pivotal role for E protein in coronavirus assembly. *J Virol* **72**: 7885–7894.
- Franco, R., Bortner, C.D., and Cidowski, J.A. (2006) Potential roles of electrogenic ion transport and plasma membrane depolarization in apoptosis. *J Membr Biol* **209**: 43–58.
- Gonzalez, M.E., and Carrasco, L. (2003) Viroporins. *FEBS Lett* **552**: 28–34.
- Grandgirard, D., Studer, E., Monney, L., Belser, T., Fellay, I., Borner, C., and Michel, M.R. (1998) Alphaviruses induce apoptosis in Bcl-2-overexpressing cells: evidence for a caspase-mediated, proteolytic inactivation of Bcl-2. *EMBO J* **17**: 1268–1278.
- Grice, A.L., Kerr, I.D., and Sansom, M.S. (1997) Ion channels formed by HIV-1 Vpu: a modelling and simulation study. *FEBS Lett* **405**: 299–304.
- Griffin, S.D., Beales, L.P., Clarke, D.S., Worsfold, O., Evans, S.D., Jaeger, J., *et al.* (2003) The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* **535**: 34–38.
- Griffin, S.D., Harvey, R., Clarke, D.S., Barclay, W.S., Harris, M., and Rowlands, D.J. (2004) A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol* **85**: 451–461.
- Han, Z., and Harty, R.N. (2004) The NS3 protein of blue-tongue virus exhibits viroporin-like properties. *J Biol Chem* **279**: 43092–43097.
- Hirose, S. (2006) A new paradigm of channelopathy in epilepsy syndromes: intracellular trafficking abnormality of channel molecules. *Epilepsy Res* **70**: S206–S217.
- Jentsch, T.J., Hubner, C.A., and Fuhrmann, J.C. (2004) Ion channels: function unravelled by dysfunction. *Nat Cell Biol* **6**: 1039–1047.
- Kalkeri, G., Khalap, N., Garry, R.F., Fermin, C.D., and Dash, S. (2001) Hepatitis C virus protein expression induces apoptosis in HepG2 cells. *Virology* **282**: 26–37.
- Karbowski, M., and Youle, R.J. (2003) Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* **10**: 870–880.
- Kato, J., Kato, N., Yoshida, H., Ono-Nita, S.K., Shiratori, Y., and Omata, M. (2002) Hepatitis C virus NS4A and NS4B proteins suppress translation *in vivo*. *J Med Virol* **66**: 187–199.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239–257.
- Klimkait, T., Strebel, K., Hoggan, M.D., Martin, M.A., and Orenstein, J.M. (1990) The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* **64**: 621–629.
- Kou, Y.H., Chou, S.M., Wang, Y.M., Chang, Y.T., Huang, S.Y., Jung, M.Y., *et al.* (2006) Hepatitis C virus NS4A inhibits cap-dependent and the viral IRES-mediated translation through interacting with eukaryotic elongation factor 1A. *J Biomed Sci* **13**: 861–874.
- Kuo, L., and Masters, P.S. (2003) The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. *J Virol* **77**: 4597–4608.
- van Kuppeveld, F.J., Hoenderop, J.G., Smeets, R.L., Willems, P.H., Dijkman, H.B., Galama, J.M., and Melchers, W.J. (1997) Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *EMBO J* **16**: 3519–3532.
- Lama, J., and Carrasco, L. (1992) Expression of poliovirus nonstructural proteins in *Escherichia coli* cells. Modification of membrane permeability induced by 2B and 3A. *J Biol Chem* **267**: 15932–15937.
- Lang, F., Lang, K.S., Wieder, T., Myssina, S., Birka, C., Lang, P.A., *et al.* (2003) Cation channels, cell Volume and the death of an erythrocyte. *Pflugers Arch* **447**: 121–125.
- Liao, Y., Yuan, Q., Torres, J., Tam, J.P., and Liu, D.X. (2006) Biochemical and functional characterization of the membrane association and membrane permeabilizing activity of the severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. *Virology* **349**: 264–275.
- Liljestrom, P., and Garoff, H. (1991) Internally located cleavable signal sequences direct the formation of Semliki Forest virus membrane proteins from a polyprotein precursor. *J Virol* **65**: 147–154.
- Loewy, A., Smyth, J., von Bonsdorff, C.H., Liljestrom, P., and Schlesinger, M.J. (1995) The 6-kilodalton membrane protein of Semliki Forest virus is involved in the budding process. *J Virol* **69**: 469–475.
- Lombardo, E., Maraver, A., Espinosa, I., Fernandez-Arias, A., and Rodriguez, J.F. (2000) VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology* **277**: 345–357.
- Lopez-Rivas, A., Castrillo, J.L., and Carrasco, L. (1987) Cation content in poliovirus-infected HeLa cells. *J Gen Virol* **68**: 335–342.
- Lowy, R.J. (2003) Influenza virus induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic mechanisms. *Int Rev Immunol* **22**: 425–449.
- Madan, V. (2006) Viroporinas de virus animales con genoma RNA. In *Dpto. Biología Molecular*. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
- Madan, V., Garcia Mde, J., Sanz, M.A., and Carrasco, L. (2005a) Viroporin activity of murine hepatitis virus E protein. *FEBS Lett* **579**: 3607–3612.
- Madan, V., Sanz, M.A., and Carrasco, L. (2005b) Requirement of the vesicular system for membrane permeabilization by Sindbis virus. *Virology* **332**: 307–315.
- Marissen, W.E., and Lloyd, R.E. (1998) Eukaryotic translation initiation factor 4G is targeted for proteolytic cleavage by caspase 3 during inhibition of translation in apoptotic cells. *Mol Cell Biol* **18**: 7565–7574.
- Masalova, O.V., Lakina, E.I., Abdulmedzhidova, A.G., Atanadze, S.N., Semiletov, Y.A., Shkurko, T.V., *et al.* (2002) Characterization of monoclonal antibodies and epitope mapping of the NS4 protein of hepatitis C virus. *Immunol Lett* **83**: 187–196.
- Melton, J.V., Ewart, G.D., Weir, R.C., Board, P.G., Lee, E., and Gage, P.W. (2002) Alphavirus 6K proteins form ion channels. *J Biol Chem* **277**: 46923–46931.
- Moon, H.S., and Yang, J.S. (2006) Role of HIV Vpr as a regulator of apoptosis and an effector on bystander cells. *Mol Cells* **21**: 7–20.
- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T.,

- and Yasuhiko, Y. (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* **277**: 34287–34294.
- Mould, J.A., Drury, J.E., Frings, S.M., Kaupp, U.B., Pekosz, A., Lamb, R.A., and Pinto, L.H. (2000) Permeation and activation of the M2 ion channel of influenza A virus. *J Biol Chem* **275**: 31038–31050.
- Neznanov, N., Kondratova, A., Chumakov, K.M., Angres, B., Zhumabayeva, B., Agol, V.I., and Gudkov, A.V. (2001) Poliovirus protein 3A inhibits tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis by eliminating the TNF receptor from the cell surface. *J Virol* **75**: 10409–10420.
- Nomura-Takigawa, Y., Nagano-Fujii, M., Deng, L., Kitazawa, S., Ishido, S., Sada, K., and Hotta, H. (2006) Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. *J Gen Virol* **87**: 1935–1945.
- O'Brien, V. (1998) Viruses and apoptosis. *J Gen Virol* **79**: 1833–1845.
- Pavlovic, D., Neville, D.C., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R.A., Fischer, W.B., and Zitzmann, N. (2003) The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 6104–6108.
- Pinto, L.H., Holsinger, L.J., and Lamb, R.A. (1992) Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**: 517–528.
- Pinton, P., Ferrari, D., Rapizzi, E., Di Virgilio, F., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (2001) The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *EMBO J* **20**: 2690–2701.
- Raj, K., Berguerand, S., Southern, S., Doorbar, J., and Beard, P. (2004) E1 empty set E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria. *J Virol* **78**: 7199–7207.
- Rapizzi, E., Pinton, P., Szabadkai, G., Wieckowski, M.R., Vandecasteele, G., Baird, G., *et al.* (2002) Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca²⁺ microdomains to mitochondria. *J Cell Biol* **159**: 613–624.
- Romanova, L.I., Belov, G.A., Lidsky, P.V., Tolskaya, E.A., Kolesnikova, M.S., Evstafieva, A.G., *et al.* (2005) Variability in apoptotic response to poliovirus infection. *Virology* **331**: 292–306.
- Ruigrok, R.W., Hirst, E.M., and Hay, A.J. (1991) The specific inhibition of influenza A virus maturation by amantadine: an electron microscopic examination. *J Gen Virol* **72**: 191–194.
- Salako, M.A., Carter, M.J., and Kass, G.E. (2006) Coxsackievirus protein 2BC blocks host cell apoptosis by inhibiting caspase-3. *J Biol Chem* **281**: 16296–16304.
- Sandoval, I.V., and Carrasco, L. (1997) Poliovirus infection and expression of the poliovirus protein 2B provoke the disassembly of the Golgi complex, the organelle target for the antipoliovirus drug Ro-090179. *J Virol* **71**: 4679–4693.
- Sanz, M.A., and Carrasco, L. (2001) Sindbis virus variant with a deletion in the 6K gene shows defects in glycoprotein processing and trafficking: lack of complementation by a wild-type 6K gene in trans. *J Virol* **75**: 7778–7784.
- Sanz, M.A., Madan, V., Carrasco, L., and Nieva, J.L. (2003) Interfacial domains in Sindbis virus 6K protein. Detection and functional characterization. *J Biol Chem* **278**: 2051–2057.
- Schlegel, A., Giddings, T.H., Jr, Ladinsky, M.S., and Kirkegaard, K. (1996) Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol* **70**: 6576–6588.
- Suhy, D.A., Giddings, T.H., Jr, and Kirkegaard, K. (2000) Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *J Virol* **74**: 8953–8965.
- Takada, S., Shirakata, Y., Kaneniwa, N., and Koike, K. (1999) Association of hepatitis B virus X protein with mitochondria causes mitochondrial aggregation at the nuclear periphery, leading to cell death. *Oncogene* **18**: 6965–6973.
- Thompson, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**: 1456–1462.
- Tolskaya, E.A., Romanova, L.I., Kolesnikova, M.S., Ivannikova, T.A., Smirnova, E.A., Raikhlin, N.T., and Agol, V.I. (1995) Apoptosis-inducing and apoptosis-preventing functions of poliovirus. *J Virol* **69**: 1181–1189.
- Ventoso, I., Blanco, R., Perales, C., and Carrasco, L. (2001) HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 12966–12971.
- Waring, P. (2005) Redox active calcium ion channels and cell death. *Arch Biochem Biophys* **434**: 33–42.
- Watanabe, T., Watanabe, S., Ito, H., Kida, H., and Kawaoka, Y. (2001) Influenza A virus can undergo multiple cycles of replication without M2 ion channel activity. *J Virol* **75**: 5656–5662.
- Wilson, L., McKinlay, C., Gage, P., and Ewart, G. (2004) SARS coronavirus E protein forms cation-selective ion channels. *Virology* **330**: 322–331.
- Wolk, B., Sansonno, D., Krausslich, H.G., Dammacco, F., Rice, C.M., Blum, H.E., and Moradpour, D. (2000) Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol* **74**: 2293–2304.
- Wurzer, W.J., Planz, O., Ehrhardt, C., Giner, M., Silberzahn, T., Pleschka, S., and Ludwig, S. (2003) Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation. *EMBO J* **22**: 2717–2728.
- Yu, X., Bi, W., Weiss, S.R., and Leibowitz, J.L. (1994) Mouse hepatitis virus gene 5b protein is a new virion envelope protein. *Virology* **202**: 1018–1023.
- Zamzami, N., and Kroemer, G. (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 67–71.

ARTÍCULO SUBMITIDO PARA PUBLICACIÓN

Cleavage of eIF4GI, eIF4GII and PABP by viral proteases. Impact on *in vitro* translation of capped and uncapped mRNAs

Alfredo Castelló,¹ David Franco,² Juan J. Berlanga,¹ Enrique Álvarez,³ Eckard Wimmer⁴ and Luis Carrasco¹

1. Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Spain.
2. The Aaron Diamond Aids Research Center, The Rockefeller University, New York, NY 10016.
3. Centro Nacional de Biotecnología, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Spain.
4. State University of New York at Stony Brook, NY 11794

Corresponding author address: Luis Carrasco, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid 28049, Spain. Phone: +34-914978450, Fax: +34-914978499, email: lcarrasco@cbm.uam.es

Key words: eIF4G; PABP; regulation of translation; poliovirus 2A; HIV protease

Running title: Translation inhibition by viral proteases

